

Tesis Doctoral

Impacto del sistema renina angiotensina en la involución mamaria y en la progresión tumoral

Cambados, Nadia

2016-10-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cambados, Nadia. (2016-10-26). Impacto del sistema renina angiotensina en la involución mamaria y en la progresión tumoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Cambados, Nadia. "Impacto del sistema renina angiotensina en la involución mamaria y en la progresión tumoral". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-10-26.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Impacto del sistema renina angiotensina en la involución mamaria y en la progresión tumoral”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el Área de Ciencias Biológicas

Autor: Nadia Cambados

Director: Dra. Carolina Schere-Levy

Consejero de estudios: Dr. Omar Coso

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE) – CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Fecha de defensa: 26 de octubre de 2016

Buenos Aires.

IMPACTO DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN LA INVOLUCIÓN MAMARIA Y EN LA PROGRESIÓN TUMORAL.

Resumen

El desarrollo de la glándula mamaria es un proceso dinámico que involucra ciclos continuos de proliferación, diferenciación y regresión. Luego de la lactancia, comienza la involución de la misma. Dicho proceso, consiste en una masiva apoptosis de las células epiteliales alveolares y en un intenso remodelado tisular, acompañado de un aumento en la expresión de factores pro-inflamatorios, devolviéndole a la glándula una estructura similar al de una hembra virgen.

Por otro lado, el sistema renina angiotensina (RAS) se vincula, actualmente, a una multiplicidad de procesos biológicos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La mayoría de los efectos de la AngII, principal efector del RAS, son mediados por el receptor AT1 (AT1-R), y se discute aún la participación del AT2 (AT2-R). En los últimos años, se descubrió que múltiples actividades biológicas del RAS involucran no sólo la acción de la AngII, sino también la de un conjunto de péptidos bioactivos como la Ang-(1-7). Diversas publicaciones indican que la Ang-(1-7) tendría una actividad antiproliferativa y antiangiogénica, contrarrestando los efectos de AngII en diversos tipos celulares.

Dado que AngII puede actuar como una citoquina pro-inflamatoria, investigamos en primer lugar, si el RAS cumple algún rol durante la involución mamaria. Demostramos por primera vez, que la AngII induce una marcada activación de STAT3 en el epitelio mamario *in vivo*. Dicho efecto, es medidado por el AT1-R. Asimismo, observamos que la inyección de AngII intramamario induce una rápida activación de ERK1/2 y un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas. Para evaluar el rol de AngII endógena, se trataron ratones con el inhibidor de AT1-R losartan, durante la involución mamaria. El bloqueo del AT1-R desencadenó un aumento en los niveles de factores de supervivencia celular AKT y Bcl-X_L, y una disminución de la expresión de los genes de respuesta temprana LIF y TNF- α , del porcentaje de células apoptóticas y de la actividad de MMP-2 y MMP-

9. Investigamos además, la relevancia de los dos subtipos del AT1-R, AT1a-R y AT1b-R, en la involución mamaria, mediante el uso de ratones deficientes para dichos receptores. Encontramos un retardo significativo en involución a las 72 y 96 hs en los ratones dobles KO AT1a/AT1b. Dicho retardo, se correlacionó con una disminución de células apoptóticas y de fibras de colágeno y reticulina.

A continuación, estudiamos el rol de AngII y Ang-(1-7) en células mamarias normales y tumorales. En células normales epiteliales mamarias, encontramos que ambos péptidos inducen activación de AKT y ERK1/2. Sin embargo, Ang-(1-7) induce menor activación y, la estimulación simultánea con ambas angiotensinas, produce un patrón de activación de AKT similar al desencadenado por Ang-(1-7). Asimismo, AngII es capaz de promover la transición epitelio mesenquimal (TEM) en dichas células, induciendo la expresión de marcadores mesenquimales y disminuyendo la expresión de marcadores epiteliales. Nuevamente, dicho efecto es contrarrestado en células pre-tratadas con Ang-(1-7). En ensayos de migración e invasión, observamos que AngII aumenta significativamente la capacidad migratoria e invasiva de líneas celulares tumorales mamarias, mientras que el pre-tratamiento con Ang-(1-7) disminuye la migración inducida por AngII a valores similares al control. Por último, demostramos que Ang-(1-7) inhibe el aumento desencadenado por AngII sobre los niveles de expresión de ARNm de VEGF y MMP-9, así como en la actividad de dicha metaloproteasa.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que AngII, a través del receptor AT1-R, juega un papel preponderante en la involución mamaria, identificándose un nuevo rol para el RAS. Asimismo, mientras que AngII promueve el desarrollo tumoral, Ang-(1-7) contrarresta los efectos desencadenados por AngII en células tumorales mamarias.

Palabras clave: glándula mamaria, involución, AngII, AT1-R, apoptosis, STAT3, metaloproteasas, Ang-(1-7), AKT, migración, transición epitelio mesenquimal

IMPACT OF THE RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM IN MAMMARY GLAND INVOLUTION AND TUMOR PROGRESSION.

Abstract.

Mammary gland development is a complex, dynamic process, which undergoes repeated cycles of growth, differentiation, and regression. After lactation, a rapid switch from survival to death signaling occurs, leading to involution. This process consists in massive apoptosis of alveolar epithelial cells and extensive tissue remodeling, together with an increase in the expression of pro-inflammatory factors. The gland is returned to a virgin-like state.

On the other hand, the renin angiotensin system (RAS) is actually associated to multiple biological processes, both in physiological and pathological conditions. Most of the effects of AngII, the main effector peptide of the RAS, are mediated by the AT1 receptor (AT1-R), while the role of AT2 (AT2-R) receptor is still controversial. During the last years, it was discovered that multiple of the biological activities of the RAS involve not only the effects of AngII, but also of a group of bioactive peptides, like Ang-(1-7). Several publications suggest that Ang-(1-7) has an antiproliferative and antiangiogenic activity, counteracting the effects of AngII in different cell types.

Since AngII can act as a pro-inflammatory cytokine, we first investigated the role of the RAS during mammary involution. We demonstrated for the first time, that AngII strongly induces STAT3 phosphorylation in the mammary epithelial cells *in vivo*. This effect is mediated by the AT1 receptor. Furthermore, we observed that intra-mammary injection of AngII induces a rapid activation of ERK1/2 and a significant increase in the percentage of apoptotic cells. To define the role of endogenous AngII, mice were treated with the AT1-R blocker losartan, during involution. Blocking the AT1-R triggered an increase in the levels of the survival factors AKT and Bcl-X_L, and decreased the expression of the early responsive genes LIF and TNF- α , the percentage of apoptotic cells and the MMP-2 and MMP-9 activity. Moreover, we analyzed the relevance of the AT1 receptor isoforms, AT1a-R and AT1b-R, during involution, in mice deficient for one or both

receptor's subtypes. We found a significant delay in involution by 72 and 96 h in double KO mice AT1a/AT1b, which was correlated with a significantly lower rate of apoptotic epithelial cells and reduced collagen and reticulin deposition.

We next studied the role of AngII and Ang-(1-7) in normal and tumor mammary cells. In normal epithelial cells, both peptides induce phosphorylation of AKT and ERK1/2, although Ang-(1-7) activated it in a lesser extent. However, pre-treatment with Ang-(1-7) prior to stimulation with AngII, produces an activation pattern similar to the one triggered by Ang-(1-7) alone. Furthermore, AngII is capable of promoting epithelial mesenchymal transition (EMT) in these cells, inducing the expression of mesenchymal markers and inhibiting the expression of epithelial ones. Once again, this effect was counteracted in cells pre-treated with Ang-(1-7). In migration and invasion assays, we found that AngII significantly increase the migration and invasion capacity of mammary tumor cell lines treated with AngII, while pre-treatment with Ang-(1-7) reduced this effect to control levels. Finally, we demonstrated that Ang-(1-7) inhibits AngII induced mRNA expression levels of VEGF and MMP-9, as well as the activity of this metalloprotease.

Our results suggest that AngII, through AT1 receptor, plays a critical role in post-lactational regression, identifying a new function for the RAS. Moreover, while AngII promotes tumor progression, Ang-(1-7) counteracts the effects triggered by AngII in mammary tumor cells.

Keywords: mammary gland, involution, AngII, AT1-R, apoptosis, STAT3, metalloproteases, Ang-(1-7), AKT, migration, epithelial mesenchymal transition.

“Obstáculos e dificuldades fazem parte da vida.

E a vida é a arte de superá-los”

DeRose.

*A mi Nonna,
a mis Padres,
a mi Hermano.*

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo es el resultado de cinco años de mucho esfuerzo y dedicación. No obstante, éste no hubiera sido posible sin aquellas personas que, de forma desinteresada, me brindaron su apoyo y su confianza. A ellos, quiero expresarles mi gratitud.

A **Caro**, por darme la posibilidad de realizar esta tesis y, principalmente, por darme la libertad de manifestar mis ideas. Gracias por escuchar mis propuestas, por enseñarme que siempre vale la pena intentarlo, y por ayudarme a ganar independencia y autoconfianza.

A **Edith**, por abrirme las puertas de su laboratorio, y por brindarme un espacio en su grupo de trabajo. Muchas gracias por cada uno de tus aportes intelectuales y por confiar en mi desempeño.

A **Karen**, por haber sido mi motor durante la primera etapa de mi doctorado. Gracias por transmitirme toda tu experiencia, por enseñarme a trabajar con pasión, y por tu constante apoyo. Gracias por estar tan presente siempre.

A **Thomas** y a su grupo de trabajo en Alemania. Por colaborar en la confección de esta tesis, por recibirme en varias oportunidades en su laboratorio, y por brindarme las herramientas necesarias para desarrollar mi trabajo. Gracias por aportarnos toda tu experiencia y conocimiento sobre el RAS: fueron fundamentales para avanzar en nuestro proyecto. *Vielen Dank für alles!*

A nuestra colaboradora, la Dra. **Marina Simian**, y a su becaria **Rocío Sampayo** del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, por ayudarnos con las inmunofluorescencias y las zimografías, que fueron parte de nuestra primera publicación. Gracias además por los reactivos prestados y por contribuir en el desarrollo y optimización de nuestros experimentos.

A **Nati Rubinstein**, por introducirme en el “mundo” de la TEM, por enseñarme y ayudarme en el manejo de las técnicas y, por sobre todo, por ser un apoyo moral importante en mi trabajo diario. Gracias por tu alegría, tu simpleza y por ser tan predispuesta. ¡Voy a extrañar tu música!

A la **Dra. Mónica Vermeulen**, por ayudarnos enormemente con el manejo de animales, por ser tan dedicada con nosotras. Al **Dr. Roberto Meiss**, por asistirnos en el análisis de los ensayos histológicos, por su paciencia. Agradezco también a **Albi**, por su generosidad durante todas mis estadías en Alemania.

A todos los laboratorios vecinos, que gentilmente me prestaron equipos, reactivos y protocolos. Gracias al **grupo de la Dra. Vázquez**, al **grupo de la Dra.**

Di Siervi, al **grupo de las Dras. Correa y Bermúdez**, y al **grupo de la Dra. Guberman**, por ser los mejores colegas que uno pudiera tener. Agradezco también al grupo del **Dr. Coluccio**, y a **todos los miembros del laboratorio 6 del CM1**, especialmente a **Dani**, por su excelente predisposición siempre.

A todo el **grupo de trabajo del Dr. Omar Coso**, por su generosidad y por trabajar junto a nosotros como un verdadero equipo. Y a **Omar** en especial, por sus enseñanzas y por su interés en nuestro trabajo.

A las **chicas Kordon** (Vic, Johi, Lourdes, Carlita, Naty), ¡muchísimas gracias! Por la paciencia y por bancarme siempre, a pesar de mis ausencias. Una mención especial al “dúo dinámico”. Gracias Johi y Vic por los favores, por sus consejos y por darme ánimo. ¡Las quiero! Mi agradecimiento también para Eva, por sus aportes científicos, y por enseñarme a mirar para adelante siempre.

A los **chicos Pecci** (a los de antes, a los de ahora...Son tantos que se hace imposible nombrarlos). Por ser un gran equipo con el que me dio mucho gusto trabajar durante todos estos años. Por compartir risas, anécdotas y opiniones de todo tipo. Gracias especialmente a **Flopy**, por bancarme siempre: por tu confianza, por cada charla y palabra de aliento, por compartir tu experiencia, por ser tan sencilla. Por ser una excelente compañera y amiga. ¡Te quiero mucho! A **Dieguito**, por los debates, por sus sugerencias, por su predisposición para ayudarme, por los reactivos prestados, por traer alegría a nuestro lugar de trabajo. A **Chocha**, por contagiarme la responsabilidad y pasión por el trabajo. Por su compromiso siempre y por transmitirme la medida justa de practicidad que tantas veces me fue necesaria. Por último, un agradecimiento más que especial a **Ada**: por su ayuda desinteresada, por estar en cada detalle, por retornos y gritarnos, por divertirnos con sus anécdotas.

A **Mariela, José y Amaranta**, ¡muchísimas gracias! El trabajo diario hubiera sido imposible sin su constante ayuda.

A **Dani De Luca**, por ser tan amable conmigo desde mis primeros días. Gracias por tu ayuda y por escucharme y entenderme.

A **Juli Farinola**, por ser mi mejor compañero de laboratorio y mi amigo. Gracias por tu buena onda, por tu complicidad y tu sinceridad. ¡Gracias por estar!

A **Daia**, mi amiga. Gracias por ser parte de mi día a día, por tu apoyo, por confiar en mí, y por ser tan incondicional. Sos lo máspreciado que me dejaron estos años de trabajo. Gracias por hacerme ver las cosas más claras. ¡Te adoro con el alma! A **Ale**, Alelí, por ponerle una sonrisa a todo, por tu alegría, por ser tan dulce y compañera. ¡Sin dudas las voy a extrañar muchísimo!

A **Andy**, a **Gaby** y a **Vane**, por hacerme sentir tan querida. Por las charlas de pasillo, por las risas y el aguante. Gracias también a **Olga**, por su predisposición, por sus consejos.

En lo personal, quisiera agradecer a mis amigos de la vida: a **Gabo, Anto, Geral, Juli, Jesi, Solchu, Pame, Hemi, Yami, Chechu y Flor**. Por no soltarme la mano nunca, por cuidarme, por quererme tanto, y por darme fuerzas durante estos años. Gracias por hacerme la vida más fácil y por ser parte de ella.

A toda la **Sede Recoleta del Método DeRose**: a los Recoletos, a mi egrégora. Gracias a cada uno de ustedes por abrimme las puertas y transmitirme esas ganas de vivir a pleno todos los días. Su energía hace que mis días se tornen más sencillos y alegres. Un agradecimiento especial a **Diegui**, a **Cesitar** y a **Kika**. Por enseñarme que siempre se puede ir un paso más adelante, y por mostrarme la importancia de valorarse y conocerse a uno mismo para alcanzar la superación personal. Gracias por ser maestros en mi vida.

A **mis papás** y a **mi hermano Leo**, por acompañarme y apoyarme en todas las etapas de mi vida. Por creer en mí y alentarme a seguir adelante. Por aguantar mis cambios de humor durante todos estos años. Por escucharme, aconsejarme y quererme tanto. Gracias por caminar junto a mí, por enseñarme a crecer. Sin ustedes este momento no sería posible.

A **mi nonna Ida**, la mujer más hermosa de mi vida. Gracias por todo lo que me enseñaste, por ser un ejemplo de lucha y fortaleza, por darme fuerzas siempre, por ese orgullo inmenso que sentías por mí. Gracias por ese último abrazo, el de nuestra despedida, que fue el empuje que me permitió llegar hasta acá.

De corazón, MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
--------------------------	----------

INTRODUCCIÓN

1. La Glándula Mamaria.....	9
1.1. <i>Desarrollo de la glándula mamaria.....</i>	9
1.2. <i>Lactancia: rol de las hormonas lactogénicas.....</i>	12
1.3. <i>Involución: factores desencadenantes y vías de señalización.....</i>	14
1.3.1. <i>Vía JAK/STAT: de PRL/JAK/STAT5 a LIF/JAK/STAT3.....</i>	16
1.3.2. <i>Vía PI3K/AKT.....</i>	18
1.3.3. <i>MAPKs: vía ERK1/2.....</i>	20
2. El Cáncer de Mama	21
2.1. <i>Aspectos generales.....</i>	21
2.2. <i>Clasificación de los tumores mamarios</i>	22
2.3. <i>Modelos experimentales para el estudio de tumores Mamarios.</i>	23
2.3.1. <i>Modelos in vitro</i>	23
2.3.2. <i>Modelos in vivo.....</i>	24
3. Sistema Renina - Angiotensina (RAS).....	25
3.1. <i>Hacia el concepto del RAS tisular: generalidades.....</i>	25
3.2. <i>Visión clásica vs visión contemporánea del RAS.....</i>	26
3.3. <i>Principales actores del RAS.....</i>	29
3.3.1. <i>Angiotensinógeno (AGT).....</i>	29
3.3.2. <i>Renina</i>	30
3.3.3. <i>Eje ECA/AngII/AT1R-AT2R</i>	30
3.3.3.1. <i>Enzima convertidora de angiotensina (ECA).....</i>	30
3.3.3.2. <i>Los receptores de AngII: AT1-R y AT2-R.....</i>	31
3.3.4. <i>Eje ECA2/Ang-(1-7)/MAS-R.....</i>	36
3.3.4.1. <i>Enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2).....</i>	36
3.3.4.2. <i>El receptor de Ang-(1-7): MAS-R.....</i>	37
3.4. <i>Antagonistas del RAS: aplicaciones clínicas</i>	41
3.4.1. <i>Antagonistas del RAS clásico.....</i>	41
3.4.1.1. <i>Inhibidores de la ECA (iECA).....</i>	42
3.4.1.2. <i>Antagonistas del receptor AT1-R (ARBs)</i>	42
3.4.1.3. <i>Inhibidores directos de la renina (DRIs).....</i>	43
4. RAS y carcinogénesis: de la investigación básica a la clínica	44

4.1. Rol del RAS en el desarrollo y progresión tumoral	44
4.1.1. Activación del RAS: efectos sobre los procesos de migración, invasión y metástasis	44
4.1.2. El RAS modula los procesos inflamatorios y la angiogénesis tumoral.....	45
4.1.3. Implicancia clínica	47
4.2. RAS y tumorigénesis mamaria	48
4.2.1. Expresión del RAS en tejido mamario	48
4.2.2. Rol del RAS en tumores de mama.....	49
4.2.3. Relevancia clínica	51

OBJETIVOS 55

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos utilizados	59
2. Cultivos de líneas celulares	59
2.1. Líneas celulares mamarias normales.....	59
2.1.1. Línea celular HC11	59
2.1.2. Línea celular NMuMG/E9.....	59
2.2. Líneas celulares mamarias tumorales	60
2.2.1. Línea celular LM3	60
2.2.2. Línea celular MDA MB-231.....	60
2.3. Tratamientos.....	60
3. Trabajo con animales.....	61
3.1. Ratones Balb/c	62
3.2. Ratones C57BL/6.....	62
3.3. Tratamientos.....	62
3.4. Extracción de tejido mamario	63
4. Ensayos bioquímicos y moleculares	64
4.1. Análisis de proteínas	64
4.1.1. Purificación de proteínas.....	64
4.1.2. Ensayo de Western blot.....	65
4.1.3. Inmunoprecipitación	67
4.1.4. Zimografía.....	67

4.1.4.1. Tejido mamario	67
4.1.4.2. Medios condicionados.....	68
4.2. Análisis de ácidos nucleicos.....	68
4.2.1. Purificación de ARNm	68
4.2.2. Transcripción reversa (RT)	69
4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	70
4.2.3.1. PCR estándar.....	70
4.2.3.2. PCR en tiempo real (RT-qPCR)	71
4.2.4. Ensayo de protección a RNasa (RPA).....	74
5. Ensayos celulares.....	75
5.1. Migración.....	75
5.1.1. Ensayo de migración por “cicatrización de herida” (Wound Healing Assay)	75
5.1.2. Ensayo de migración a través de cámaras transwell	76
5.2. Transición Epitelio Mesenquimal (TEM)	77
5.3. Ensayo de proliferación	77
6. Estudios morfológicos e histológicos	78
6.1. Inmunohistoquímica (IHQ)	78
6.2. Técnica de TUNEL	79
6.3. Inmunofluorescencia (IF).....	80
6.3.1. Líneas celulares.....	80
6.3.2. Tejido mamario	82
7. Análisis estadístico	82

RESULTADOS

Capítulo 1.

1. Rol de la AngII y de los componentes del RAS en la involución mamaria post-lactancia	85
1.1. Análisis de la expresión de los componentes del RAS en la glándula mamaria normal de ratón.....	85
1.1.1. Análisis de la expresión del RAS durante la involución mamaria	86
1.2. AngII induce la activación de STAT3 en la glándula mamaria lactante de ratón	90

1.3. <i>AngII induce la activación de ERK1/2 en la glándula mamaria lactante de ratón</i>	93
1.4. <i>AngII induce la muerte celular programada en el epitelio mamario</i>	94
1.5. <i>El bloqueo de AT1-R resulta en una disminución de los niveles de apoptosis y un retardo en la involución mamaria</i>	95
1.5.1. <i>Efectos del antagonismo del receptor AT1-R en la modulación de la expresión y/o activación de factores locales y de supervivencia durante la involución</i>	99
1.6. <i>El bloqueo de AT1-R afecta el proceso de remodelado tisular durante la involución mamaria</i>	101
1.7. <i>Ratones deficientes en las isoformas AT1a y AT1b de AT1-R, presentan un retardo en el proceso de involución</i>	103

Capítulo 2.

2. <i>Ang-(1-7) un nuevo péptido que contrarresta los efectos pro-tumorales del eje ECA/AngII/AT1-R</i>	109
2.1. <i>Análisis de la expresión de los receptores AT1-R y MAS-R en líneas celulares mamarias normales y tumorales</i>	109
2.2. <i>Efecto de Ang-(1-7) sobre la activación de factores de supervivencia y MAPKs, mediada por AngII</i>	110
2.2.1. <i>Análisis del perfil de activación de AKT en células epiteliales normales mamarias, en presencia de AngII y/o Ang-(1-7)</i>	110
2.2.2. <i>Análisis del perfil de activación de ERK1/2 en células epiteliales normales mamarias, en presencia de AngII y/o Ang-(1-7)</i>	114
2.3. <i>Efectos de AngII y Ang-(1-7) sobre la Transición Epitelio Mesenquimal (TEM), en la línea celular mamaria NMuMG</i>	116
2.3.1. <i>Análisis de la expresión de marcadores de TEM en presencia de AngII y/o Ang-(1-7)</i>	116
2.3.2. <i>AngII induce la TEM, a través de la vía de activación de AKT.</i>	119
2.4. <i>Ang-(1-7) inhibe los efectos pro-angiogénicos y pro-invasivos mediados por AngII</i>	120
2.4.1. <i>Ang-(1-7) contrarresta los efectos de AngII sobre la</i>	

<i>migración e invasión celular, en células tumorales mamarias.....</i>	121
2.4.2. <i>Análisis de la expresión y/o activación de VEGF y MMP-9 en células tumorales mamarias</i>	124

DISCUSIÓN

Capítulo 1.

1. Rol de la AngII y de los componentes del RAS en la involución mamaria post-lactancia	129
1.1. <i>Análisis de la expresión de los componentes del RAS en la glándula mamaria normal, durante la involución</i>	130
1.2. <i>AngII induce la activación de STAT3 y ERK1/2, así como la apoptosis del epitelio mamario durante la involución.....</i>	131
1.3. <i>El receptor AT1-R cumple un rol clave en el desarrollo de la involución mamaria</i>	133

Capítulo 2

2. Ang-(1-7): un nuevo péptido que contrarresta los efectos pro-tumorales del eje ECA/AngII/AT1-R	137
2.1. <i>Ang-(1-7) contrarresta los efectos de AngII, respecto a la activación de factores de supervivencia y MAPKs, en células epiteliales mamarias no tumorales.....</i>	138
2.2. <i>Análisis de los efectos de AngII y Ang-(1-7) sobre la Transición Epitelio Mesenquimal (TEM), en células epiteliales mamarias no tumorales.....</i>	139
2.3. <i>Ang-(1-7) inhibe los efectos pro-angiogénicos y pro-invasivos mediados por AngII</i>	140

CONCLUSIONES.....	145
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	149
---------------------------	------------

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AGT	Angiotensinógeno
AKT	Protooncogen viral de timoma 1
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
AngII	Angiotensina II
ARB	<i>Angiotensin Receptor Blocker</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AT1-R	Receptor de AngII tipo 1
AT2-R	Receptor de AngII tipo 2
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína linfoma 2 de células B
Bcl-X _L	Proteína tipo Bcl-2 isoforma 1
BSA	Albúmina Sérica Bovina
COX-2	Ciclooxigenasa 2
cpm	cuentas por minuto
DAB	3,3'diaminobencidina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DKO	<i>Double Knock-Out</i>
E-cadh	Cadherina Epitelial
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
ER	Receptor de Estrógeno
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FISH	Hibridación Fluorescente <i>in situ</i>
FN	Fibronectina
GAS	Sitio Activado por Interferón- γ
H&E	Hematoxilina y Eosina
HER	Receptor de Estrógeno Humano
iECA	Inhibidor de ECA
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
JAK	Quinasa c-Jun N-terminal
kDa	kiloDalton
KO	<i>Knock-Out</i>

LIF	Factor Inhibitorio de Leucemia
MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitógeno
MAS-R	Receptor MAS (receptor de Ang-(1-7))
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteasa de Matriz
MMTV	Virus Tumoral Mamario de Ratón
<i>MrgD</i>	<i>Mas-related G-protein receptor member D</i>
N-cadh	Cadherina Neural
NFκB	Factor Nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
OSM	Oncostatina M
pb	pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
pERK	ERK fosforilado
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-quinasa
PKC	Proteína Quinasa C
PR	Receptor de Progesterona
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de Prolactina
pSTAT	STAT fosforilado
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RAS	Sistema Renina Angiotensina
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RPA	Ensayo de Protección a RNasa
rpm	revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
STAT	Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción
TBS	Buffer Tris Salino
TEB	Brote del Extremo Terminal
TEM	Transición Epitelio Mesenquimal
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante- β
TIMP	Inhibidor Tisular de Metaloproteasa
TN	Tumores Triple Negativo
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
tPA	Activador de Plasminógeno tipo Tisular

uPA	Activador de Plasminógeno tipo Uroquinasa
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
WAP	<i>Whey acidic protein</i>
wt	<i>wild type</i>
α -SMA	α -Actina de Músculo Liso

INTRODUCCIÓN

1. La Glándula Mamaria.

La glándula mamaria, es un órgano secretor complejo, que experimenta continuamente cambios estructurales y funcionales. Está constituida por diferentes tipos celulares: células epiteliales (luminales y basales) que forman la red de ductos de la glándula, células endoteliales vasculares que forman los vasos sanguíneos, y una variedad de células del sistema inmune. El epitelio luminal constituye la capa apical de los ductos y alvéolos secretorios, mientras que el basal consiste principalmente en células mioepiteliales que rodean el epitelio luminal (Watson and Khaled, 2008). El estroma se encuentra constituido principalmente por fibroblastos y adipocitos. Estos últimos, constituyen la almohadilla de grasa (*fat pad*), en donde los ductos están embebidos.

1.1 Desarrollo normal de la glándula mamaria.

La glándula mamaria es el único órgano cuyo desarrollo morfológico y funcional ocurre casi totalmente luego del nacimiento (Silberstein and Daniel, 1987; Williams and Daniel, 1983). A diferencia de otros órganos, el mayor crecimiento del parénquima ocurre al finalizar la pubertad, convirtiéndolo en un modelo único para estudios de desarrollo y especificidad en animales adultos. Estas transformaciones ocurren y progresan a través de estadios definidos, comenzando en la pubertad y continuando durante la preñez, hacia el momento en el cual tiene lugar el amamantamiento, que es el propósito funcional de esta glándula (Smith and Medina, 1988). La glándula mamaria murina es un órgano ampliamente utilizado para el estudio tanto del desarrollo mamario normal como tumoral. Ésta atraviesa repetidos ciclos de crecimiento, diferenciación y regresión, los cuales corresponden a los estadios fisiológicos de embarazo, lactancia e involución respectivamente (Hennighausen and Robinson, 1998). Asimismo, cada uno de estos eventos requiere de la acción de hormonas sistémicas y factores de crecimiento y diferenciación locales que actúan tanto en los componentes del estroma como del epitelio de la glándula mamaria. Es característica fundamental del desarrollo mamario el intercambio finamente regulado entre el epitelio y el estroma. En el ratón existen 5 pares de mamas, cada una de las cuales posee un pezón externo que se conecta con el ducto primario epitelial el cual, a su vez, se ramifica en ductos y dúctulos de menor diámetro que desembocan en el lumen de los alvéolos secretorios de leche durante la lactancia. Se suelen utilizar las mamas #4 y 5 para los ensayos experimentales dado su fácil acceso y mayor volumen mamario (Richert et al., 2000).

Al momento del nacimiento, las hembras poseen una glándula mamaria muy rudimentaria, compuesta por un sistema simple de túbulos que se ramifican abriéndose desde el pezón (Hogg et al., 1983). Estas estructuras permanecen quiescentes hasta el momento de la entrada en la pubertad, que ocurre aproximadamente a las 3 semanas de vida. En los machos, la testosterona actúa sobre las células del mesénquima inhibiendo el desarrollo de la glándula mamaria; mientras que en las hembras, las hormonas ováricas actúan sobre las células del mesénquima estimulando el desarrollo de la misma. En la pubertad, los niveles de hormonas ováricas aumentan, induciendo una intensa actividad mitótica en los brotes terminales de los conductos, donde se forman estructuras compuestas por múltiples capas de células epiteliales cuboides denominadas “*terminal end buds*” (TEBs) (BRESCIANI, 1965). Los TEBs son los frentes de los conductos que invaden, penetran, extienden y se ramifican dentro del *fat pad*. Están formados por varias capas de células epiteliales y una capa de células madre pluripotentes e indiferenciadas que dan origen a las células mioepiteliales y luminales. La división celular, iniciada desde los TEBs, continúa hasta que el *fat pad* es llenado por completo con los conductos, formando una estructura de tipo árbol ramificado. El cese de la ramificación ocurre simplemente por una cuestión de espacio físico, ya que al alcanzar el límite del *fat pad* no queda más espacio disponible para seguir creciendo. En ese momento, aproximadamente a las 12 semanas de vida, desaparecen los TEBs y los conductos quedan en estado de quiescencia (Faulkin and Deome, 1960).

Durante la preñez, comienza un nuevo ciclo de rápida proliferación, esta vez seguido de diferenciación, estableciéndose las estructuras lóbulo-alveolares sobre la estructura ya desarrollada de conductos ramificados (Silberstein and Daniel, 1987). La división celular en las células de los conductos y los alveolos ocurre durante toda la preñez, persistiendo incluso durante la fase temprana de la lactancia. En dicho proceso, participan niveles elevados de estrógeno y progesterona, otras hormonas esteroideas ováricas y hormonas pituitarias. Durante la etapa temprana de la preñez, las células epiteliales proliferan, los conductos se elongan, se ramifican y se establecen las estructuras lóbulo-alveolares. En la segunda mitad de la preñez, ocurre principalmente la diferenciación de los alvéolos. Éstos poseen dos capas de células: las luminales secretoras, y las basales mioepiteliales, que forman los elementos contráctiles de los alvéolos para la expulsión de leche. Al término de la preñez, de aproximadamente 20 días de duración en el ratón, los alvéolos completan su maduración, reemplazando completamente el tejido estromal de la mama. Estas estructuras persisten hasta el final de la lactancia y son las unidades funcionales

para la producción y secreción de la leche. Hacia el final de la preñez y luego del parto, se produce una abrupta caída de los niveles circulantes de estrógeno y progesterona en sangre. A partir de este momento la arquitectura funcional de la glándula se mantiene principalmente gracias a la prolactina, liberada desde la glándula pituitaria en respuesta al estímulo de succión de las crías, y a la colaboración de los glucocorticoides, los cuales utilizan diferentes mecanismos moleculares para controlar tanto el desarrollo de la glándula mamaria como la síntesis de proteínas de la leche (Freeman, 1980; Reichardt et al., 2001). La leche es expulsada de manera constitutiva desde el lumen alveolar hacia los ductos drenantes por la contracción de las células mioepiteliales en respuesta a la hormona oxitocina.

El período de lactancia es el estadio de máxima diferenciación de la glándula mamaria. Éste perdura por 3 semanas, momento en el cual las crías ya ingieren alimento sólido (Masso-Welch et al., 2000; Richert et al., 2000).

Al término de la lactancia, la glándula mamaria atraviesa un proceso de muerte celular programada y reestructuración, desencadenado rápidamente en respuesta a la remoción del estímulo de succión. Dicho proceso se denomina involución. Durante el mismo, el 90% del epitelio sufre apoptosis y es reemplazado por tejido estromal. La involución mamaria puede separarse en dos fases. La fase inicial o temprana, está regulada localmente por la síntesis y liberación de factores que se secretan en respuesta a la acumulación de la leche en la glándula, debido a la falta de succión de la misma (Li et al., 1997; Lund et al., 1996). Esta fase es seguida de una segunda etapa o fase tardía de la involución, causada por la pérdida de la circulación sistémica de hormonas lactogénicas (principalmente prolactina y glucocorticoides). Dicha etapa se caracteriza no sólo por la muerte del epitelio, sino también por la acción de proteasas extracelulares que controlan la reestructuración y el remodelado tisular de la mama (Lund et al., 1996). Al término del período de involución, el epitelio secretor ya ha sido removido por completo y reemplazado por tejido adiposo, adquiriendo la glándula una estructura y estado de diferenciación similar al de una hembra virgen madura (**Figura I-1**).

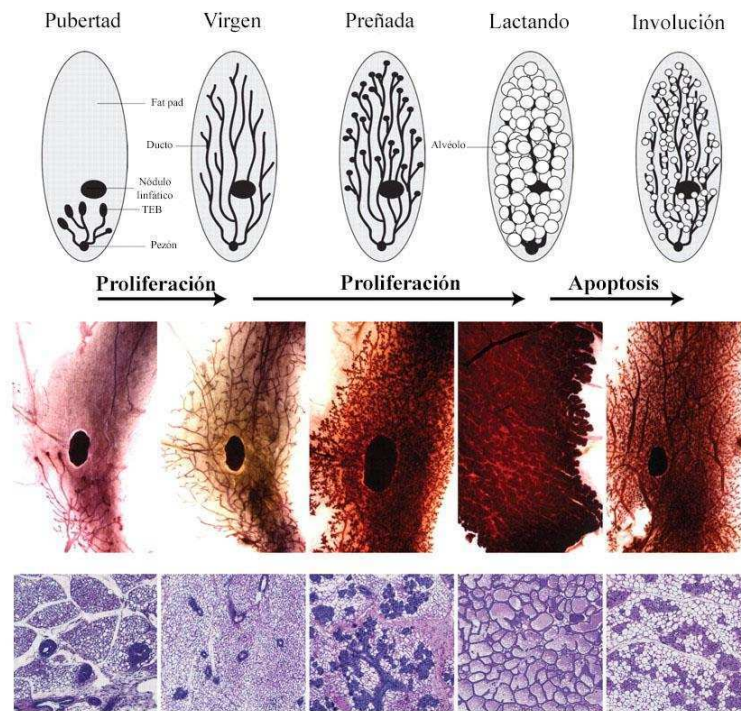


Figura I-1. Ilustración esquemática del desarrollo de la glándula mamaria de ratón. Cada estadio del esquema está acompañado de preparaciones de glándula mamaria total y cortes histológicos. (Adaptado de Andrechek et al., 2008).

1.2 Lactancia: rol de las hormonas lactogénicas.

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica, sintetizada principalmente en la glándula pituitaria. Si bien ésta participa de numerosos procesos biológicos en vertebrados (CS, 1974), su rol ha sido principalmente descrito en la glándula mamaria, en donde actúa como el principal regulador de la proliferación y la diferenciación de las estructuras lóbulo-alveolares durante la preñez (Freeman, 1980). La PRL ejerce sus funciones al interactuar con un receptor perteneciente a la superfamilia de receptores de citoquinas tipo I: el receptor de prolactina (PRLR). Dicha interacción resulta en la dimerización del receptor y en la activación de las tirosina quinasas *Janus kinase 2* (JAK2), *Fyn* y *c-Src* asociadas al dominio intracelular del PRLR. Se produce así una fosforilación cruzada entre ellas, y una fosforilación del dominio intracelular del receptor en sus residuos tirosina (Hennighausen et al., 1997) (Acosta et al., 2003). En consecuencia, se activan diferentes vías de señalización tales como la vía JAK/STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) y PI3K (*Phosphoinositide 3 Kinase*)/AKT. En la glándula mamaria, la PRL actúa mayormente a través de la vía mediada por JAK2-STAT5 (Liu et al., 1997). Esta vía consiste en el reclutamiento de la quinasa hacia el PRLR, y a través de los dominios SH2 expuestos del complejo, se reclutan los factores STAT5 que se encuentran libres en

el citoplasma. JAK2 fosforila predominantemente a las dos isoformas de STAT5 (5a y 5b) en la tirosina 694 (Ihle and Kerr, 1995). Los factores STAT5 así activados, translocan en forma de dímeros hacia el núcleo donde se unen a sitios activados por *interferón- γ* (GAS) de promotores de distintos genes, por ejemplo, β -caseína (Csn), *wehy acidic protein* (WAP) y β -lactoglobulinas (BLG), induciendo la transcripción de los mismos (**Figura I-2**). Es relevante destacar, que esta vía de señalización está sujeta al control preciso de numerosos reguladores positivos y negativos, los cuales incluyen a las integrinas. Éstas son los principales receptores de matriz extracelular (MEC), y son requeridos para la activación de STAT5 (Naylor et al., 2005).

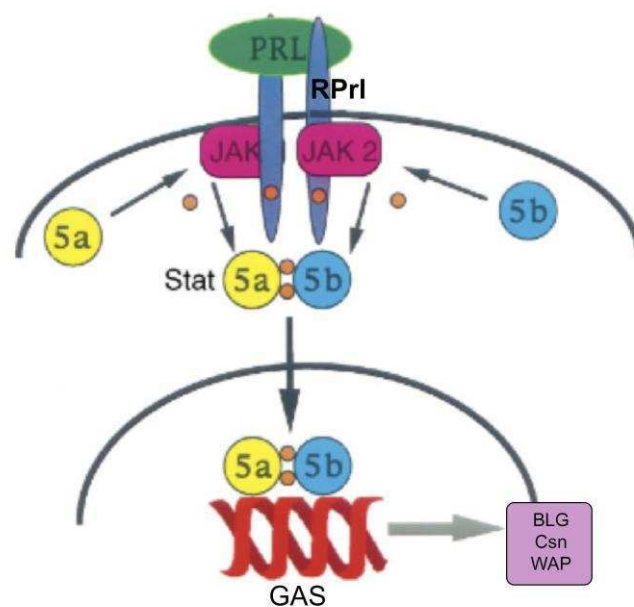


Figura I-2. Vía de señalización de la prolactina (PRL). El RPrI se activa por unión de la PRL provocando su dimerización y el consecuente reclutamiento de la tirosina quinasa asociada al receptor JAK2 a su dominio intracelular. JAK2 se autofosforila y fosforila al dominio citoplasmático del RPrI, generando un sitio de unión para STAT5A. Al unirse, STAT5A es fosforilado por JAK2, se libera, dimeriza y transloca al núcleo, se une a las secuencias GAS, e induce la expresión de genes blanco, tales como BLG, Csn y WAP, promoviendo la proliferación, diferenciación y lactogénesis. Los círculos naranja representan fosforilación. (Adaptado de Hennighausen et al., 1997).

En mamas de hembras vírgenes o durante la etapa temprana de la preñez, los niveles de activación de STAT5a y STAT5b se encuentran muy bajos. Durante la lactancia, se produce un pico de activación de dichos factores, observándose altos niveles de las formas fosforiladas, las cuales se hacen prácticamente indetectables al comenzar la involución mamaria (Liu et al., 1997). Ambas isoformas de STAT5 son capaces de formar homo o heterodímeros, siendo necesaria la heterodimerización para alcanzar un estado de completa diferenciación que permita el desarrollo normal de la lactancia (Liu et al., 1997).

1.3 Involución: factores desencadenantes y vías de señalización.

Al producirse el destete, se inicia el proceso de involución mamaria. Tal como se mencionó anteriormente, éste es un proceso complejo que comprende no sólo la muerte celular del epitelio secretorio, sino también el flujo controlado de macrófagos y otras células del sistema inmune, capaces de remover las células muertas, la leche residual y el *debris*. La primera fase de la involución mamaria en el ratón dura hasta 3-4 días y se desencadena por la ausencia de succión por parte de las crías. Esto a su vez genera acumulación de leche en los alveolos, provocando estiramiento de las células (*stretching*) e induciendo una rápida liberación de factores locales que actúan en forma autócrina/parácrina. Dichos factores, inducen la activación de STAT3 y/o desencadenan apoptosis del epitelio. Algunos ejemplos son el LIF, IL-6, TNF- α , entre otros. Cabe destacar que, la liberación de factores locales y la activación de STAT3 son los principales actores en esta etapa temprana. Hacia el cuarto día de involución y a medida que las células alveolares van siendo removidas, el epitelio comienza a desorganizarse, pero las estructuras alveolares aún se hallan presentes. Luego en la segunda fase o fase tardía, entre los 6 y 8 días post destete, todos los alvéolos colapsaron y la mayor parte de la apoptosis ya ha ocurrido. El remodelado de la glándula continúa hasta el día 21 aproximadamente, momento en el cual adquiere una estructura y estado de diferenciación similar al de una hembra virgen madura, con la mayoría de su superficie ocupada por adipocitos (Richert et al., 2000).

La muerte del epitelio secretorio se da a través de un tipo de muerte celular programada conocido como apoptosis, que a diferencia de la necrosis no produce respuesta inflamatoria (Earnshaw, 1999). Asimismo, dichos eventos van acompañados de la ruptura de la MEC, el remodelado de vasos sanguíneos, y la re-diferenciación de adipocitos para regenerar el *fat pad*. (Watson and Kreuzaler, 2011). Dado que la involución natural producida por la falta de succión de las crías luego de tres semanas de lactancia es un proceso lento y progresivo, como modelo experimental para el estudio de este estadio, se utilizan hembras a las que se les retiran las crías luego de 5-10 días de lactancia. En este modelo, el retiro abrupto de las crías genera una involución sincronizada, en la que ocurren los mismos eventos que en la involución natural (Quarrie et al., 1996).

Al iniciarse la involución, se produce un cambio en la activación de cascadas de señales específicas y la regulación de la expresión de genes que inducen la apoptosis del epitelio secretorio. Este tipo de muerte celular, involucra la activación de una cascada de proteasas específicas, denominadas caspasas, que pertenecen a una familia altamente conservada de cisteína-proteasas. Las primeras

caspasas que se activan se conocen como caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10), y aquellas que llevan a cabo el proceso apoptótico se denominan caspasas efectoras (3, 6 y 7). Una vez activadas las caspasas efectoras, el proceso de muerte se vuelve irreversible. A su vez, estas cascadas de caspasas pueden activarse, al menos, a través de dos vías: la vía intrínseca, o vía mitocondrial, o a través de la vía extrínseca, o de receptores de muerte (Gewies A., 2003).

En particular, la muerte apoptótica del epitelio secretorio durante la involución, se produce, principalmente por la vía mitocondrial (Marti et al., 1997). No obstante, durante las primeras 12 horas, también se produce la activación de la vía extrínseca, como consecuencia del significativo aumento de los ligandos de receptores de muerte TNF- α , TWEAK, FasL y TRAIL durante este período (Clarkson et al., 2004). Además, se han reportado modificaciones en los niveles de expresión de los miembros de la familia de los genes Bcl: aumento de las formas pro-apoptóticas (Bax y Bcl-X_s) y disminución de las anti-apoptóticas (Bcl-X_L y Bcl-2) (Watson, 2006). El proceso de apoptosis se desencadena y se mantiene prácticamente durante todo el periodo de involución mamaria, si bien es más masivo durante la fase temprana (Lund et al., 1996).

Las fases de la involución mamaria pueden diferenciarse a partir de los aspectos morfológicos asociados a cada una de ellas. Durante la primera fase, las células epiteliales alveolares se aplastan y comienzan a sufrir apoptosis, siendo luego extruídas hacia el lumen y fagocitadas por las células epiteliales vecinas o por macrófagos que invaden la región. Asimismo, en este estadio inicial de involución, la estructura del epitelio de la glándula mamaria permanece organizada, se conservan las estructuras lóbulo-alveolares, y es considerado reversible durante las siguientes 48 horas post-destete. Esto significa que, mediante el agregado del estímulo de succión, se reanuda el amamantamiento. Sin embargo, pasadas las 48 horas, se inicia la transición hacia la segunda fase o fase tardía. En consecuencia, las estructuras lóbulo-alveolares comienzan a colapsar, y el epitelio es reemplazado por el estroma. Este estadio es irreversible, ya que el suplemento de leche se pierde, y es independiente del agregado del estímulo de succión. A diferencia de la primera fase de involución, regulada por factores locales propios de la glándula, esta segunda etapa depende de la caída en los niveles de hormonas sistémicas, y puede ser bloqueada mediante la administración de glucocorticoides (Li et al., 1997; Marti et al., 1997). Las hormonas lactogénicas estarían funcionando como factores de supervivencia durante la lactancia, y su caída induciría también el proceso de apoptosis. Por otro lado, el proceso de remodelado y reestructuración de la mama, característico de esta etapa, es

dependiente de la acción de metaloproteasas específicas de matriz (MMPs). Principalmente, se produce un aumento en los niveles de expresión de las gelatinasas MMP-9 y MMP-2, cuya actividad se encuentra bloqueada en la primera fase por la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). Asimismo, se ha reportado que la MMP-3 y MMP-11 también participan del proceso de involución (Green and Lund, 2005). Al igual que la familia de MMPs, los activadores de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y tipo tisular (tPA) también actúan durante el remodelado tisular. Éstos activan la serina proteasa plasmina, la cual degrada proteínas de MEC (Lijnen, 2001). Si bien unas pocas estructuras alveolares pueden persistir en la glándula luego del proceso de involución, ésta resulta morfológicamente muy similar a la de una hembra virgen (**Figura I-3**).

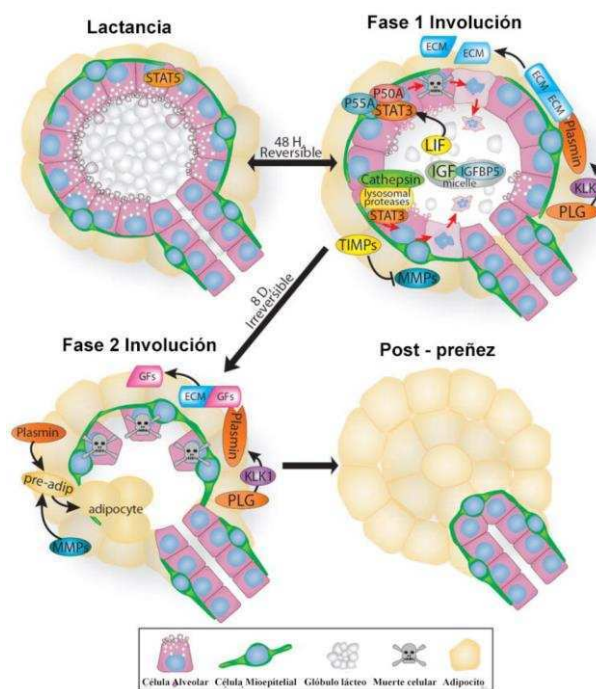


Figura I-3. Ilustración de las dos fases de la involución mamaria. LIF induce la fosforilación de STAT3, principal modulador de la primera fase de la involución, el cual induce la expresión de proteasas lisosomales, cathepsinas, IGFBP5, p50 α y p55 α . Durante esta fase, PLG es convertido en plasmina, y se produce la muerte celular y la proteólisis parcial de la MEC, mientras que los alvéolos conservan su forma. En la segunda fase, las MMPs son liberadas por sus inhibidores (TIMPs), las cuales junto con la plasmina, favorecen la liberación de factores de crecimiento y remodelan la MEC. Los alvéolos colapsan, los adipocitos se diferencian, y la glándula mamaria retorna a su estado pre-lactante. (Adaptado de Macias & Hink, 2012).

1.3.1 Vía JAK/STAT: de PRL/JAK/STAT5 a LIF/JAK/STAT3.

La vía JAK/STAT es el mecanismo principal de señalización que utilizan diversas citoquinas y factores de crecimiento en la regulación de la proliferación, el

estado de diferenciación, la migración celular y la muerte en múltiples procesos como la hematopoyesis, el desarrollo del sistema inmune y la adipogénesis (Rawlings et al., 2004). En particular, en el epitelio mamario, es una de las vías críticas en determinar el estado de diferenciación, la supervivencia y la muerte por apoptosis. El inicio de la involución mamaria se caracteriza por un cambio en el patrón de fosforilación de miembros específicos de la familia STAT: una disminución en los niveles de pSTAT5a, pSTAT5b y sus formas sin fosforilar, y un marcado aumento de pSTAT3 (Li et al., 1997; Liu et al., 1997).

STAT3: el mediador esencial de la involución mamaria.

Inicialmente, el marcado aumento de los niveles de fosforilación de STAT3 en la involución mamaria reveló su potencial rol durante este estadio. Se ha demostrado, que ratones que poseen deleciónado el gen de Stat3, tienen un retardo significativo en la involución mamaria (Chapman et al., 1999). Estos resultados fueron posteriormente confirmados por otro grupo de trabajo independiente, en ratones *KO* para STAT3 (STAT3-KO) (Humphreys et al., 2002). En ambos estudios, la ausencia de STAT3 retrasó la fase de la involución, demostrando la importancia de la activación de este factor de transcripción en el inicio de la apoptosis y el remodelado de la glándula durante la involución mamaria.

En la última década, se han identificado numerosas vías de señalización que regulan el fin de la lactancia y el comienzo del proceso de involución mamaria. La familia de proteínas STAT, ha demostrado cumplir roles importantes en dicha transición, regulando el flujo de señales de supervivencia. Se han postulado diversos mecanismos a través de los cuales STAT3 es activado en involución. Durante la fase temprana, la estasis de la leche y los glucocorticoides cumplen una función primordial en la activación de dicho factor. Se ha demostrado que la acumulación de leche es la principal causa de activación de STAT3. La misma se produce, debido a la producción de factores locales que se liberan en respuesta al estiramiento provocado por la acumulación de leche en los alveolos. Dentro de los factores locales descritos hasta el momento, el factor inhibitorio de leucemia (LIF) es el principal factor capaz de activar a STAT3 (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003). En ausencia de LIF, los niveles de fosforilación de STAT3 son muy bajos, resultando en un retardo en involución, similar al observado en glándulas Stat3 *-/-* (Kritikou et al., 2003). Una vez activado, STAT3 regula directamente la expresión de las subunidades p50 α y p55 α de PI3K. De esta forma, se altera la composición de PI3K, restringiendo su actividad y, consecuentemente, la actividad de AKT (Abell et al., 2005). Dado que los niveles de LIF disminuyen

durante la involución tardía, un miembro de la familia de citoquinas IL-6 altamente homólogo a LIF, Oncostatina M (OSM), se une a su receptor OSMR, convirtiéndose en el principal activador de STAT3 durante esta fase. A diferencia de la activación de STAT3 inducida por LIF, OSM provoca la desfosforilación de STAT5, incluso en presencia de PRL (Tiffen et al., 2008).

LIF: el activador de STAT3 en el epitelio mamario.

El LIF es una glicoproteína de secreción de 38 a 67 kDa que pertenece a la familia de citoquinas de la familia de IL-6 y su nombre deriva del efecto que se observó que tiene en la diferenciación de células leucémicas mieloides a macrófagos (Gearing et al., 1987).

Es interesante que, más allá de la redundancia funcional que existe entre los integrantes de la familia de IL-6 en varios tejidos, trabajos de nuestro laboratorio así como también de Christine Watson, identificaron al LIF como responsable fisiológico de la activación de la vía JAK/STAT3 en el epitelio mamario, al inicio de la involución mamaria post-lactancia (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003). En el primero de los trabajos, se demostró que LIF y su receptor (LIFR) se expresan durante los diferentes estadios del desarrollo mamario. Se encontró, que los niveles de expresión de LIF son altos durante el desarrollo temprano y el inicio de la preñez, luego disminuyen hasta niveles indetectables durante la lactancia, y aumentan significativamente al inicio de la involución mamaria, alcanzando un pico a las 48 horas luego del destete, sin observar modulación de los niveles de la subunidad específica de su receptor (gp190). Además, se demostró mediante implantes de pellets de LIF, que este factor era capaz de activar STAT3 e inducir apoptosis del epitelio en mamas en fase de lactancia, donde los niveles de STAT3 son prácticamente indetectables (Schere-Levy et al., 2003). Este trabajo aportó además evidencias de que la muerte del epitelio secretorio no depende de los niveles de hormonas lactogénicas circulantes, sino que se desencadena en respuesta a un estímulo local. En paralelo, el grupo de C. Watson observó que en las glándulas mamarias de ratones LIF-KO, la involución sufría un retraso, con niveles de fosforilación de STAT3 más bajos y la muerte por apoptosis marcadamente disminuida (Kritikou et al., 2003).

1.3.2. Vía PI3K/AKT.

AKT es una quinasa con actividad en residuos serina y treonina que presenta tres isoformas proteicas, AKT1, AKT2 y AKT3 con una homología estructural del 85%. En diferentes sistemas, se han identificado distintos blancos de fosforilación

por AKT implicados en la supervivencia celular. AKT es capaz de bloquear la activación de la caspasa-9, de inducir el secuestro del factor de transcripción Forkhead (involucrado en la expresión de Fas ligando) y de fosforilar, y en consecuencia inactivar, a la proteína pro-apoptótica Bad. AKT fosforila, a su vez, a la quinasa IKK, responsable de la fosforilación del factor inhibidor de NF κ B (I κ B), regulando así positivamente la señal de supervivencia determinada por la activación de este factor de transcripción (Kane et al., 1999). AKT regula también la función de p53, activa a diversos factores de la transcripción y fosforila varias enzimas implicadas en la captación de la glucosa y en la síntesis de lípidos, glucógeno y proteínas. Por lo tanto, la fosforilación de diversos sustratos mediada por AKT puede promover cambios a nivel de proliferación celular, supervivencia, metabolismo, diferenciación celular y motilidad, entre otras actividades (Manning and Cantley, 2007). Debido a la importancia del tejido adiposo y su remodelado durante el ciclo de preñez/lactancia/involución, es que AKT cumple un rol crítico en el desarrollo de la glándula mamaria.

La importancia de la vía PI3K/AKT durante la involución mamaria fue demostrada primeramente por un estudio llevado a cabo por el grupo de Anderson, en el cual se sobre-expresó una mutante constitutivamente activa de AKT bajo el promotor de MMTV, el cual se activa significativamente durante el período de lactancia en el epitelio mamario. Los resultados muestran un retardo marcado en la aparición de células apoptóticas y en el remodelado de la glándula durante la involución (Schwertfeger et al., 2001). Posteriormente, estos resultados fueron confirmados por otros trabajos que utilizaron otros modelos de transgénicos que sobre-expresan AKT (Ackler et al., 2002; Hutchinson et al., 2001). Estos estudios, revelaron la importancia de la disminución de los niveles de activación de AKT en la transición entre lactancia e involución, anteriormente mencionada.

Tal como se explica en el apartado "STAT3: el mediador esencial de la involución mamaria", la apoptosis del epitelio mamario durante la involución es mediada principalmente por STAT3, a través de altos niveles de LIF. Sin embargo, si bien esencial, STAT3 no es suficiente para la apoptosis, ya que la expresión de un transgen de Akt constitutivamente activo resulta en una señal de supervivencia predominante. El grupo de Watson ha demostrado que la I κ B quinasa 2/ β (IKK2), reguladora del factor de transcripción NF κ -B, actúa como un factor pro-apoptótico en el epitelio mamario diferenciado. La delección condicional del gen que codifica para IKK2, provoca un retardo en el proceso de involución y remodelado, así como la ausencia de clivaje de caspasa 3. Dichos efectos se asocian a una disminución en

la expresión de TNF y de su receptor TNFR1, ambos blancos de NFκ-B. A su vez, esto último se vincula con un aumento en los niveles de AKT activo. De esta forma, actualmente se postula a AKT como una molécula centinela, cuyos niveles de fosforilación determinarían el balance entre la supervivencia y la muerte celular, en el epitelio mamario (Baxter et al., 2006).

1.3.3. MAPKs: vía ERK 1/2.

Las MAPKs son activadas por diversos tipos de estímulos y han sido asociadas al control de procesos celulares tan importantes como la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, y la apoptosis. ERK 1 y 2 (*Extracellular signal- Related Kinases*) se encuentran entre las MAPKs mejor descritas, y son las principales ERKs en mamíferos (Katz et al., 2007).

La vía de MAPK de ERK1/2 se activa generalmente a través de receptores con actividad tirosina quinasa o de receptores acoplados a tirosina quinasas como las JAKs, o de receptores acoplados a proteínas G. ERK1 y ERK2, son activadas por las MAPKs MEK1 y MEK2 al ser fosforiladas en el motivo conservado TEY específico de las ERKs. Las proteínas blanco de ERK1/2 incluyen factores de transcripción (Elk-1, Ets 1 y 2, Sap1a, m-Myc, c-Fos), proteínas adaptadoras, enzimas quinasa (p90RskS6, fosfolipasa A2) y receptores de superficie celular y nuclear (como el receptor del factor de crecimiento epidermal y los receptores estrogénicos), entre otros. Desde una perspectiva fisiológica, la señalización por ERK1/2 participa principalmente en procesos mitogénicos, en la migración celular y, en algunos casos, en la diferenciación celular (Katz et al., 2007).

Al analizarse los niveles de expresión y fosforilación de la MAPK ERK1/2 y de pSTAT3 en las mamas de ratones *KO* para LIF, se observó una disminución de los niveles de pERK en etapas tempranas del desarrollo mamario. Asimismo, y a pesar de haberse reportado bajos niveles de pERK en mamas en involución de ratones *wild type*, se vio que éstos disminuían aún más en ausencia de LIF. Sin embargo, mientras los niveles de pSTAT3 se mantienen durante horas, los de pERK1/2 disminuyen rápidamente.

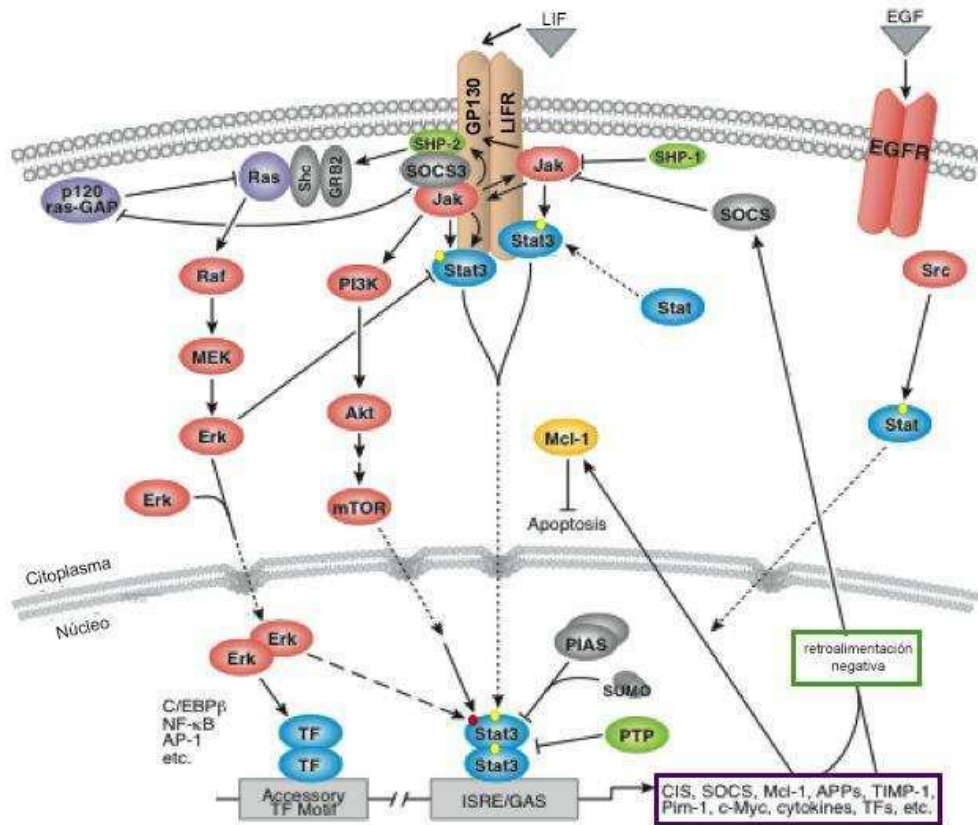


Figura i-4. Activación de la vía JAK/STAT e interacciones con otras vías. Esquema del mecanismo de activación de la vía JAK/STAT y sus interacciones con las vías de EGFR, MAPKs y PI3K/AKT. En círculos amarillos y rojos se indican los tipos de fosforilaciones que sufre STAT3. Fosforilaciones en tirosina: amarillo; fosforilaciones en serina: rojo. (Adaptado de http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Jak_Stat_IL_6.html).

2. El Cáncer de Mama.

2.1. Aspectos generales.

Luego de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres adultas (entre 20 y 59 años), y la principal causa de muerte por cáncer en dicho sector de la población (Jemal et al., 2011; Stewart and Wild, 2014). Aunque las mayores incidencias fueron halladas en América del Norte y Europa, tanto la Argentina como Uruguay muestran índices de mortalidad muy altos, similares a los de las regiones del hemisferio norte (Parkin, 2004).

Entre los años 2002 y 2007, el incremento del número de casos nuevos de cáncer de mama en los países en desarrollo fue dos veces mayor que el observado en los países desarrollados. En Argentina se encuentran 75 casos cada 100.000 mujeres, una incidencia similar a la que tiene Uruguay y a las observadas en los Estados Unidos de América y Canadá (Lozano-Ascencio et al., 2009). A pesar de

que la mortalidad por cáncer de mama en nuestro país ha tendido a disminuir levemente entre 1979 y el 2005, es la primera causa de muerte por cáncer dentro de la población femenina argentina.

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y actualmente existe suficiente información epidemiológica que sustenta la asociación de varios factores con el riesgo de desarrollar tumores mamarios. Por un lado, se encuentran aquellos relacionados con la biología reproductiva de la mujer, entre los que cabe mencionar: el no haber tenido hijos antes de los 30 años, la menopausia posterior a los 55 años, la menarca temprana, los tratamientos hormonales (como consumo prolongado de anticonceptivos), las terapias de reemplazo hormonal, estrógenos y progestágenos. Por otro lado, si bien 8 de cada 10 mujeres que padecen cáncer de mama no presentan una historia familiar de la enfermedad, el riesgo se duplica o se triplica si existen antecedentes de uno o dos familiares de sangre (principalmente madre o hermana), respectivamente. Por último, los factores ambientales, tales como la exposición a radiaciones, así como el estilo de vida (la mala alimentación, la obesidad, el consumo de alcohol, el estrés, poca actividad física), también contribuyen al riesgo de desarrollar cáncer de mama (American Cancer Society, 2016).

2.2. Clasificación de los tumores mamarios.

El cáncer de mama comprende tumores heterogéneos con diferentes características clínicas, desarrollo de la enfermedad y respuestas a tratamientos específicos. Características intrínsecas de los tumores, como las obtenidas por histología clásica y las clasificaciones inmunopatológicas, así como también subtipos moleculares más recientemente descritos, han permitido la clasificación y separación de los tumores de mama en varios grupos. Las características extrínsecas del tumor, como el microambiente tumoral, también tienen importancia pronóstica y amplían aún más la lista de variables relevantes.

Desde el punto de vista histológico, los tipos de cáncer de mama reportados con mayor frecuencia son, en primer lugar, el carcinoma ductal invasivo no especificado (aproximadamente el 75% de los casos), y en segundo lugar, el carcinoma lobular invasivo (aproximadamente 10% de los casos) (Li et al., 2005a). En conjunto, estas dos categorías y combinaciones de los mismos constituyen la gran mayoría (alrededor del 90%) de los cánceres de mama, mientras que el resto se clasifican como medular, neuroendocrino, tubular, apocrino, metaplásico, mucinoso (A y B), inflamatorio, comedones, adenoides quístico, y los tipos micropapilares (Li et al., 2005a; Weigelt et al., 2010).

Por otro lado, la presencia de marcadores moleculares específicos en cáncer de mama, ha sido ampliamente utilizada tanto para definir subtipos con pronóstico global diferencial, como para identificar tumores susceptibles a tratamientos dirigidos. Los principales marcadores que se evalúan en la actualidad son: el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), y el receptor epidérmico humano 2 (HER2). La detección de los dos primeros marcadores, se realiza casi exclusivamente por inmunohistoquímica (IHQ), mientras que la detección de HER2 se realiza por IHQ e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Las combinaciones de estos marcadores permiten la asignación de casos individuales a las siguientes categorías específicas: luminales A (ER+/PR+/HER2-), luminales B o triple positivos (ER+/PR+/HER2+), HER2 (ER-/PR-/HER2+) y basales o triple negativos (TN) (ER-/PR-/HER2-). Todos ellos, difieren en su patrón de expresión génica, sus características clínicas, su respuesta terapéutica y su pronóstico (Schnitt, 2010). Desde un punto de vista pronóstico, los tumores ER⁺ exhiben el mejor resultado global. Tras el advenimiento de nuevas terapias, los tumores HER2⁺, que previamente eran asociados con un mal pronóstico, ahora exhiben un resultado global mejorado (Slamon et al., 2001; Smith et al., 2007). Tumores TN, por otro lado, están vinculados al peor pronóstico entre los subtipos (Nishimura and Arima, 2008), mientras que en los casos de triple positivos el pronóstico depende del grado histológico del tumor (Parise and Caggiano, 2014).

2.3. Modelos experimentales para el estudio de tumores mamarios.

Los avances en el estudio de la biología del cáncer, se originan en la disponibilidad de diferentes modelos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, los cuales permiten investigar diversos aspectos de la enfermedad. A continuación, se destacarán algunos de ellos.

2.3.1. Modelos *in vitro*.

Uno de los modelos *in vitro* más utilizados, son las líneas celulares. En la actualidad, existen numerosas líneas celulares de cáncer de mama, las cuales han demostrado ser una herramienta muy útil para el estudio de los mecanismos biológicos involucrados en el desarrollo de los diferentes tipos de tumores mamarios. Algunos ejemplos de las líneas celulares de cáncer de mama humanas más utilizadas, son: MCF-7, MDA MB-231, MDA MB-435, T47D y BT-20. Entre las de origen murino, cabe mencionar la línea celular LM3, utilizada en el presente trabajo. El uso de líneas celulares en el estudio de dicha patología, permite obtener mayor información acerca de la desregularización de genes y vías de señalización propias de la misma. En este sentido, la caracterización de dichas líneas resulta

esencial para el desarrollo de nuevas drogas anti-tumorales y terapias dirigidas, comprender sus mecanismos de acción, así como sus patrones de sensibilidad/resistencia (Nakatsu et al., 2005; Ruhe et al., 2007). Una de las principales ventajas del uso de líneas celulares, es su sencilla manipulación la cual, en algunos casos, es incluso una característica exclusiva del modelo. Las líneas celulares pueden ser manipuladas genética y epigenéticamente utilizando agentes desmetilantes (Louzada et al., 2012), vectores de expresión (Nakatsu et al., 2005), y ARNsi; o bien pueden ser manipuladas farmacológicamente (Kao et al., 2009). Particularmente el uso de ARNsi, se ha convertido en un nuevo campo de estudio, el cual apunta al silenciamiento de diversos oncogenes (Shen et al., 2012). Por lo tanto, el uso de modelos *in vitro* como las líneas celulares mencionadas, son cruciales para la investigación asociada a procesos relevantes en la tumorigénesis mamaria, así como en otros tipos de tumores. Entre ellos, la proliferación, apoptosis, migración e invasión celular, metástasis, fibrosis y angiogénesis. Asimismo, este tipo de modelos permiten definir potenciales marcadores moleculares (van Staveren et al., 2009), y caracterizar nuevas terapias anti-tumorales (Kao et al., 2009; Nakatsu et al., 2005).

Por otro lado, en las últimas décadas se han desarrollado modelos en 3D para estudios *in vitro* de la glándula mamaria normal y tumoral. Para estimular la condición 3D en cultivo, se utilizaron biomatrices del tipo MEC, tales como colágeno I y membrana basal reconstituida (por ejemplo, *Matrigel*). Estos modelos mantienen las interacciones entre células y de las células con la matriz extracelular, pudiendo estudiar los efectos que se producen en estas interacciones, generadas por diferentes factores en las células tumorales (Sternlicht et al., 1999). Las diferencias fenotípicas entre células normales y tumorales, sólo se hace evidente en este tipo de cultivos, demostrando que las interacciones célula-MEC son importantes para el crecimiento y la diferenciación. Asimismo, los cambios en estas interacciones podrían influenciar el inicio y/o progreso del cáncer de mama (Hansen, 2000).

2.3.2. Modelos *in vivo*.

Los modelos animales son una herramienta muy poderosa y de gran utilidad para el estudio de la glándula mamaria tumoral. El fácil acceso y manipulación de la glándula mamaria en ratones facilita dicho propósito. Los modelos animales, han sido utilizados para el estudio de la mayoría de los importantes descubrimientos que contribuyeron a dilucidar los factores involucrados en los distintos procesos biológicos que atraviesa la glándula mamaria.

En los últimos años, el desarrollo de animales manipulados genéticamente ha permitido investigar el rol de determinados factores en el desarrollo normal y neoplásico de la glándula mamaria. La especificidad tisular en la expresión de estos factores se ha logrado a través de la utilización de promotores determinados como son el LTR del virus del tumor mamario murino (MMTV) o aquellos que lideran genes de proteínas de la leche como WAP.

Los adenocarcinomas mamarios de ratones endocriados son de uso corriente en la oncología experimental dado que ofrecen varias ventajas. En primer lugar, el tumor se localiza en un área circunscripta bajo la piel y puede ser fácilmente reconocido, medido cuantitativamente y removido para cualquier tipo de estudio. En segundo lugar, debido a la existencia de cepas endocriadas de ratones con incidencias reproducibles de neoplasias mamarias. Por último, se conoce mucho acerca de la biología del ratón y por lo tanto puede ser fácilmente sujeto a manipulaciones experimentales (Nandi and MacGrath, 1973).

3. Sistema Renina - Angiotensina (RAS).

3.1 Hacia el concepto del RAS tisular: generalidades.

El Sistema Renina Angiotensina (RAS) fue inicialmente definido como un sistema peptídico, de características endócrinas, cuyo rol fundamental consistía en la regulación del equilibrio hidrosalino y la presión arterial. Desde la identificación de la renina en el año 1898 por Tigerstedt y Bergmann, este sistema ha sido ampliamente estudiado, principalmente debido a su importancia en el desarrollo de la hipertensión, y su vinculación con patologías cardiovasculares (Basso and Terragno, 2001).

Uno de los avances más significativos de las últimas décadas, en el campo de estudio del RAS, fue el descubrimiento del RAS tisular o local. Este concepto surge, luego de haberse demostrado que dicho sistema se expresa en la mayor parte de los tejidos del organismo, cumpliendo una multiplicidad de funciones. Entre ellos se incluyen el corazón (van Kats et al., 1998), el riñón (Kobori et al., 2001), el cerebro (Moulik et al., 2002), el páncreas (Ghiani and Masini, 1995), así como las gónadas (Thomas and Sernia, 1990) y los tejidos linfático (Iwai et al., 1996) y adiposo (Karlsson et al., 1998). Con respecto a la glándula mamaria, han sido publicado trabajos en los cuales se muestra la expresión de los receptores de AII tanto en tejido mamario normal como tumoral humano, encontrando un aumento en los niveles de ARNm de ambos receptores en el tejido tumoral (Tahmasebi et al.,

2006; Vinson et al., 2012). Al respecto, es importante destacar que la regulación de la expresión génica de los diversos componentes del RAS difiere entre los distintos tejidos, sugiriendo una cierta autonomía de los diferentes sistemas tisulares (Bader et al., 2001). De esta forma, el RAS cumple funciones diversas en cada tejido. Asimismo, en algunos de ellos, tales como las glándulas adrenales y el cerebro, el RAS tisular es regulado independientemente del RAS circulante. Dicha conclusión proviene de experimentos en los cuales, luego de una nefrectomía (desregulación de la formación de angiotensina II (AngII) en el plasma), no se observaron cambios, o bien se detectó una regulación hacia arriba de los niveles de AngII local. Por el contrario, en otros órganos tales como el corazón y el riñón, el RAS tisular y circulante actúan de manera sinérgica. Componentes del sistema, tales como la renina y el angiotensinógeno, son captados de circulación y almacenados localmente, de manera que éstos se encuentren disponibles para la síntesis de AngII *in situ* (Paul et al., 2006). Sin embargo, si existe un común denominador entre los sistemas locales, con respecto a su rol fisiológico, éste reside en el mantenimiento de un equilibrio u homeostasis a nivel tisular, contribuyendo así al desarrollo de patologías específicas de cada tejido.

La introducción del concepto de RAS tisular, ha permitido redefinir al sistema no sólo como un sistema endócrino, sino también parácrino, autócrino e incluso intrácrino, vinculándose el mismo a una multiplicidad de procesos biológicos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. De esta manera, la AngII, el péptido efector más importante del RAS y mediador fisiológico en la homeostasis del sistema circulatorio, es actualmente considerado un factor de crecimiento involucrado en eventos clave de la respuesta inflamatoria (Ferrario, 2002). Brevemente, ésta promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el crecimiento, migración y diferenciación celular, la apoptosis, la remodelación de la MEC, así como la regulación génica y activación de múltiples vías de señalización intracelulares (Rüster and Wolf, 2006).

3.2 Visión clásica vs visión contemporánea del RAS.

La visión clásica o canónica del RAS, describe al sistema como una vía proteolítica limitada únicamente a la producción de un único péptido biológicamente activo: la AngII. El punto de partida de la cascada enzimática, es el angiotensinógeno (AGT). Dicha glicoproteína es liberada por el hígado al torrente sanguíneo (Deschepper, 1994; Menard J, Bouhnik J, Clauser E, Richoux JP, 1983) para luego ser clivada por la renina, una aspartil proteasa secretada por el riñón (Hackenthal et al., 1990; Persson et al., 2004). El resultado de dicho clivaje, es el

deca péptido denominado angiotensina I (AngI) (AI, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu). A continuación, la AngI es clivada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), una dipeptidil carboxipeptidasa mayormente expresada en la superficie de células endoteliales de la microvasculatura pulmonar (Corvol et al., 1995; Ng KK, 1967; Soubrier et al., 1993). Se produce así el octapéptido AngII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), principal efector del RAS. Las acciones de la AngII resultan de su interacción con dos receptores de membrana, el receptor de AngII tipo 1 (AT1-R) y el receptor de AngII tipo 2 (AT2-R) (**Figura I-5**). En roedores, se expresan dos isoformas del AT1-R, el AT1a-R y el AT1b-R, los cuales son codificados por dos genes distintos. Dichos subtipos resultan indistinguibles farmacológicamente (De Gasparo, 2002).

La aparición de nuevos péptidos y enzimas intermediarias durante los últimos 10 años, condujo hacia un cambio drástico en la concepción del RAS. Con respecto a la síntesis de AngII, se ha incorporado una vía alternativa, partiendo del clivaje de AngI por una serin proteasa llamada quimasa (Wolny et al., 1997). Luego, AngII puede ser clivada en circulación por la aminopeptidasa A o M, generando angiotensina (2-8) (AngIII) o angiotensina (3-8) (AngIV) respectivamente. Ambos péptidos han demostrado ser biológicamente activos. AngIII se une a los mismos receptores que AngII, produciendo efectos similares a esta última, si bien con menor potencia (Reaux et al., 2001). AngIV, en cambio, actúa a través de su propio receptor: el receptor de AngII tipo 4 (AT4-R), identificado como la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP), actuando principalmente a nivel de la memoria y el conocimiento (Albiston et al., 2007).

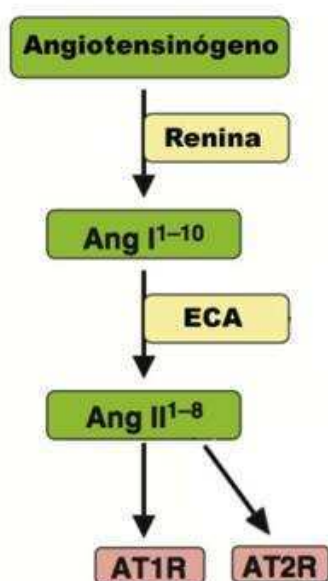


Figura I-5. Esquema del RAS clásico o canónico. El AGT es clivado por la renina es generando AngI. Luego, la ECA cliva a esta última produciendo AngII, la cual ejerce sus acciones biológicas al ponerse en contacto con los receptores AT1 y AT2. (Adaptado de Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

Sin embargo, la visión contemporánea o no canónica del sistema, surge principalmente tras el descubrimiento y clonado de una segunda carboxipeptidasa: ECA2 (Donoghue et al., 2000). Ésta es la encargada de remover la Phe de la AngII, dando origen al heptapéptido Ang-(1-7) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) (Crackower et al., 2002; Ferrario and Chappell, 2004). Asimismo, si bien en menor medida, Ang-(1-7) puede sintetizarse a través de otras vías: directamente a través del clivaje de AngI por diferentes endopeptidasas (POP, NEP, TOP), o por el clivaje directo de AngII por POP o PCP. Existe una tercera vía indirecta de síntesis de Ang-(1-7), la cual implica el clivaje de AngI en Ang-(1-9) por ECA2 o por las endopeptidasas ya mencionadas, y de esta última en Ang-(1-7) por ECA, NEP, TOP o POP (Ferrario and Iyer, 1998; Rice et al., 2004). Luego de su síntesis, Ang-(1-7) puede ser metabolizada a Ang-(1-5) por ECA o a Ang-(1-4) por NEP (Allred et al., 2000) **(Figura I-6)**. Al igual que la AngII, la Ang-(1-7) ejerce su acción a través de la unión a un receptor específico de membrana, producto del protooncogen Mas (MAS-R) (Santos et al., 2003). Se ha demostrado que, especialmente en condiciones patológicas, la Ang-(1-7) contrarresta la mayoría de los efectos deletéreos de la AngII. Asimismo, Varagic et al. reportó recientemente que Ang-(1-9) produce efectos similares a los de Ang-(1-7) a nivel cardiovascular (Varagic et al., 2014), a través de AT2-R. Por último, en el año 2013 Lautner et al. identificaron un nuevo péptido denominado alamandina, el cual se expresa tanto en ratón y rata como en el humano. Dicho heptapéptido, se genera por la acción catalítica de ECA2 en Ang A o por decarboxilación de Ang-(1-7) en el residuo aspartato del N-terminal. Alamandina interacciona con un receptor de 7 pasos transmembrana denominado MrgD y, al igual que Ang-(1-7), promueve la vasodilatación y la antifibrosis (Villela et al., 2014) **(Figura I-6)**.

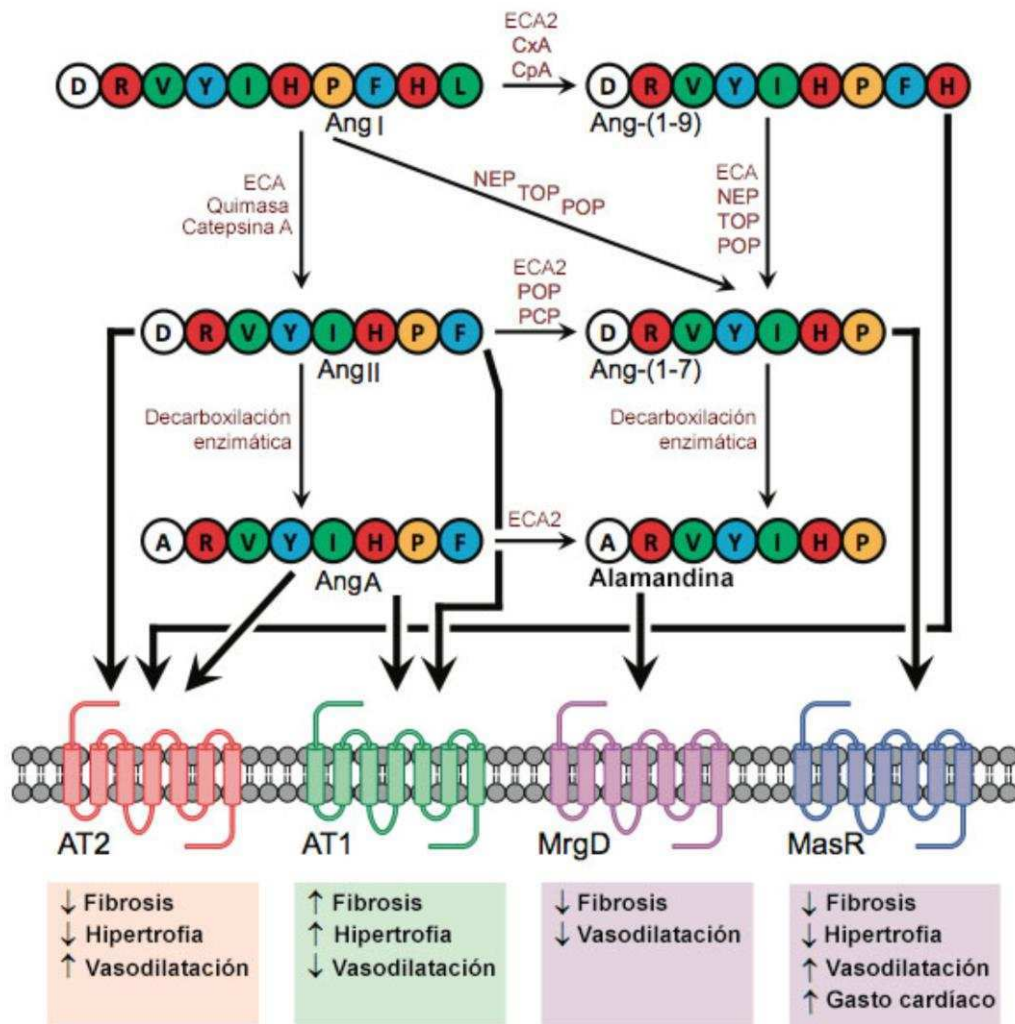


Figura I-6. Visión contemporánea o no canónica del RAS. Las diferentes reacciones enzimáticas se encuentran detalladas en el texto. Se incluyen los principales efectos de cada uno de los péptidos, mediados por sus receptores correspondientes. (Adaptado de Mendoza-Torres et al., 2015).

3.3. Principales actores de RAS.

En esta sección se focalizará en la estructura y función de los principales efectores del RAS. Además, se mencionarán los descubrimientos más recientes en torno a cada uno de ellos.

3.3.1 Angiotensinógeno (AGT).

AGT es una glicoproteína plasmática heterogénea, perteneciente a la superfamilia de inhibidores de serin proteasas, que codifica para una proteína de 485 aminoácidos en humanos y 482 aminoácidos en ratón. Ambas variantes son similares desde el punto de vista génico, en términos de tamaño, estructura y exones codificantes.

AGT es sintetizado principalmente en el hígado, el cual lo secreta de manera constitutiva hacia el plasma o compartimentos extracelulares. Esta proteína no se almacena en gránulos secretorios, lo cual implica que sus niveles son regulados principalmente a nivel transcripcional y post-transcripcional (Klett C, Hellmann W, 1988). Además de en el hígado, el ARNm de AGT ha sido detectado en mayor medida en el tejido adiposo, el cerebro, el corazón, los riñones y los vasos sanguíneos (Cassis et al., 1988; Ian Phillips et al., 1993). En este contexto, los factores locales de cada tejido en particular jugarían un rol clave en la regulación de la expresión de AGT (Suzuki et al., 1988). Por último, AGT es el primer y único sustrato de la cascada proteolítica del RAS y, por lo tanto, cumple un rol fundamental dentro de la misma.

3.3.2 Renina.

La renina es una aspartil proteasa, sintetizada como una pro-enzima denominada pro-renina. Su maduración fisiológica ocurre exclusivamente en las células yuxtaglomerulares renales (Nguyen et al., 2002), luego del clivaje de 43 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal de la pro-renina. Tal como se mencionó recientemente, su principal función es la de catalizar la hidrólisis de AGT, generando el decapeptido AngI. La actividad catalítica de la renina parece ser el paso limitante en la generación de AII circulante, ya que el AGT se encuentra en exceso en el plasma. Por otro lado, cabe destacar que la presencia de renina en los distintos tejidos, no ha sido sencilla de documentar, lo cual generó un desafío al concepto de un RAS tisular completo y autónomo. La caracterización de diversas proteínas, capaces de unirse a pro-renina y/o renina (CATANZARO, 2005; Nguyen et al., 2004), permitió identificar un mecanismo, a través del cual AngII es sintetizada localmente en exceso, con respecto a la AngII producida en el plasma.

3.3.3. Eje ECA/AngII/AT1R-AT2R.

3.3.3.1 Enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La ECA, también conocida como peptidil-dipeptidasa A, es una dipeptidilcarboxipeptidasa perteneciente a la familia de las zinc metaloproteinasas. Dicha enzima, tiene como función principal catalizar la conversión del decapeptido AngI al octapeptido AngII, tras la remoción del dipéptido His-Leu del extremo C-terminal (Acharya et al., 2003). No obstante, la especificidad de ECA es relativa o de amplio espectro, ya que es capaz de clivar una gran variedad de oligopéptidos, entre ellos la bradikinina (BK): un péptido vasodilatador, que se inactiva luego de ser clivado por ECA (Riordan, 2003).

Se han identificado dos variantes de ECA en humanos, ambas codificadas en el mismo gen, el cual consiste de 26 exones y 25 intrones. La variante más larga, conocida como ECA somática (ECAs), se encuentra asociada a células endoteliales, epiteliales y neuroepiteliales; mientras que la variante más corta, se denomina ECA testicular o germinal (ECAt), dado que se expresa únicamente en células espermáticas (Riordan, 2003).

ECA cuenta con una expresión ubicua en plasma y endotelio y está presente en numerosos tejidos como ser útero, testículos, placenta, vasos, corazón, cerebro, corteza adrenal, riñón, leucocitos circulantes y macrófagos alveolares. Un análisis de expresión génica por microarrays, indica que el ARNm de ECAs se expresa virtualmente en todos los tejidos (Coates, 2003). De esta forma, esta peptidasa no sólo afecta el control de la presión arterial, sino también varios procesos fisiológicos relevantes que incluyen la hematopoyesis, la reproducción, el desarrollo y función renal, y la respuesta inmune. No obstante, como se explicó previamente, la expresión del RAS a nivel tisular, también contribuye al desarrollo de patologías en el órgano en el que se expresa.

La incidencia de los niveles de ECA en el desarrollo de patologías, explica la razón por la cual, hace varias décadas, dicha enzima es blanco de estudio para la síntesis de drogas capaces de inhibir su funcionamiento (iECA). Los mecanismos de acción así como la implicancia clínica de dichos compuestos serán abordados en detalle más adelante.

3.3.3.2 Los receptores de AngII: AT1R y AT2R.

Los receptores de AngII se encuentran dentro de las componentes claves del RAS, siendo los encargados de mediar las funciones del principal péptido efector del sistema. Desde el punto de vista farmacológico, éstos se dividen en dos clases: el receptor de tipo 1 (AT1-R) y el receptor de tipo 2 (AT2-R). (Timmermans et al., 1993). El AT1-R es el responsable de mediar la mayoría de los efectos fisiológicos y patológicos ejercidos por la AngII, a través de complejos sistemas de señalización que serán detallados a continuación. Dicho octapéptido dejó de ser considerado simplemente una hormona vasoactiva, redefiniéndose como una hormona pleiotrópica capaz de influir en los procesos necesarios para el desarrollo y progreso de diversas patologías. Entre las múltiples funciones de AngII, se destacan:

- a) *Modulación del crecimiento y proliferación celular, así como de la apoptosis, la fibrosis y el remodelado tisular:* actuando de modo autócrino y/o parácrino, AngII es capaz de inducir hiperplasia e hipertrofia a través de la estimulación

directa de la síntesis de ADN, ARN y proteínas en diversos tejidos. Asimismo, regula la acumulación de colágeno, la migración celular, la producción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y la síntesis de metaloproteasas (tales como las MMPs) importantes en los procesos de remodelación tisular (Browatzki et al., 2005; Rüster and Wolf, 2006).

b) *Regulación de la presión arterial*: actúa fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central (SNC), en donde es absolutamente independiente del RAS circulante, y adicionalmente en los tejidos periféricos (McKinley et al., 2003).

c) *Modulación de múltiples funciones del SNC*: incluye el desarrollo y migración neuronal, el procesamiento de información sensorial, la regulación de respuestas emocionales, la memoria, el aprendizaje (Paul et al., 2006), las respuestas vinculadas al *stress*, la regulación del flujo cerebrovascular y mantenimiento de la funcionalidad de la barrera hematoencefálica (Wosik et al., 2007). Además, está involucrada en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Nahmod et al., 1978).

d) *Regulación del equilibrio hidrosalino*: estimula la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, regula la secreción de vasopresina u hormona antidiurética (ADH), y estimula los centros dipsogénicos a nivel de SNC (Leung, 2004).

e) *Regulación del tono vascular*: mediante su acción vasoconstrictora del músculo liso vascular. AngII facilita la transmisión adrenérgica y estimula la síntesis de factores endoteliales constrictores como la endotelina-1 (ET-1), incrementando de manera indirecta el tono vascular (Dohi et al., 1992). Asimismo, cumple un rol preponderante en el mantenimiento de la homeostasis de la pared vascular, modulando el balance entre los niveles de óxido nítrico (NO) y ROS en el endotelio (Paul et al., 2006).

f) *Promoción de la hematopoyesis*: luego del descubrimiento de que la ECA marca hemangioblastos embrionarios humanos primitivos (Zambidis et al., 2008), se postula que el RAS cumpliría un rol crítico en la regulación de los estadios más tempranos de la diferenciación hematoendotelial en humanos.

g) *Efecto protrombótico*: tras inducir un aumento en la expresión del factor tisular (TF) y del inhibidor del factor activador del plasminógeno (PAI-1) (He et al., 2006).

h) *Participación en la respuesta inflamatoria*: la AII induce el reclutamiento de leucocitos al sitio de injuria, regula la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas, es capaz de estimular la producción de TNF- α en diversos tipos celulares (Peeters et al., 1998), activar al factor de transcripción NF- κ B en leucocitos, músculo liso vascular y endotelio (Han et al., 1999), regular la producción de factores de crecimiento como TGF- β , PDGF y EGF (Peeters et al., 1998), e inducir la síntesis de metaloproteasas (MMP-1 y MMP-2 y MMP-9) participantes del proceso de remodelación tisular (Guo et al., 2008).

El AT1-R es el que predomina en el tejido adulto y se distribuye de manera ubicua en el organismo, expresándose principalmente en el hígado, glándulas adrenales, cerebro, pulmón, riñón, corazón, vasculatura, entre otros. Compuesto por 359 aminoácidos, y con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa, el AT1-R pertenece a la superfamilia de receptores de 7 pasos transmembrana acoplados a proteínas G. Éste presenta un dominio extracelular que contiene tres sitios de glicosilación. Mutaciones de los mismos demostraron que no afecta la unión de compuestos agonistas. La interacción con proteínas G ocurren en el dominio transmembrana en el extremo amino terminal, así como en el primero y tercer *loop* extracelular (Mehta and Griendling, 2007). Asimismo, se han identificado cuatro residuos cisteína en el dominio extracelular, los cuales forman puentes disulfuro esenciales para la unión de AngII (Ohyama et al., 1995). Al igual que los demás receptores de esta superfamilia, el dominio citoplasmático del AT1-R contiene diversos residuos serina/treonina, que son fosforilados por quinasas asociadas a receptores de proteína G (GRKs).

El AT1-R humano deriva de un único gen que contiene 5 exones. En roedores, se identificaron dos isoformas del AT1-R: AT1a-R y AT1b-R, los cuales presentan un 95% de homología en su secuencia aminoacídica (Iwai et al., 1996; Sasamura et al., 1992). Con respecto a su organización genómica, el gen *at1a* contiene 4 exones (Takeuchi et al., 1993), mientras que el gen *at1b* contiene sólo 3 (Guo and Inagami, 1994). Ambos subtipos de receptores son indistinguibles desde el punto de vista funcional y farmacológico (Gasc et al., 1994).

Estudios focalizados en las vías de señalización mediadas por AT1-R, muestran que dicho receptor induce señales que van de unos pocos segundos hasta horas. La mayor parte de los mecanismos ocurren luego de que el receptor se acopla a complejos de proteínas G del tipo $G\alpha_{q/11}$ (si bien también puede unirse a los del tipo $G\alpha_{12/13}$, and $G\beta\gamma$) (Ushio-Fukai et al., 1998). Una vez estimulado por AngII, el AT1-R es fosforilado en sus residuos serina/treonina por las GRKs, desensibilizando al receptor al desacoplarlo de su proteína G activada. La posterior

internalización del receptor, es mediada por un grupo de proteínas multifuncionales llamadas β -arrestinas (Lefkowitz, 1998). Las subunidades activadas del complejo $G\alpha_{q/11}$, estimulan a la fosfolipasa C (PLC), provocando la hidrólisis de lípidos de membrana, activación de la proteína quinasa C (PKC) y movilización intracelular de Ca^{2+} . Asimismo, la activación de AT1-R induce una potente señalización oxidativa, a través de la acción de complejos NADPH (Garrido and Griendling, 2009). Estas vías participan en los procesos de inflamación y angiogénesis (Hunyady and Catt, 2006). Por otro lado, las subunidades $G\alpha_{q/11}$ activadas, inducen la activación de diversas vías de señalización tales como MAPK (JNK, p38 y ERK 1/2), PI3K/AKT, JAK-STAT, generando respuestas celulares diversas (de Gasparo et al., 2000). Otras de las vías mediadas por AT1-R, es la de transactivación de receptores tirosina quinasa (RTK), tales como el receptor de EGF (EGFR) (Smith et al., 2004; Suzuki and Eguchi, 2006). Es interesante destacar que, hace unos años, se publicaron trabajos en los que se observó que el AT1-R puede funcionar también como un sensor de estiramiento (*stretch sensor*), pudiendo ser activado por stress mecánico en ausencia de su ligando (Hunyady and Turu, 2004). En la **Figura I-7**, se muestran de forma esquemática las principales vías de señalización inducidas a través de AT1-R. Por otro lado, dado que la transactivación inducida por AT1-R se asocia fundamentalmente a procesos de crecimiento celular, supervivencia, hipertrofia y migración, diversos trabajos muestran la contribución de dicha señalización al desarrollo y progresión tumoral (Arora et al., 2008; Gschwind et al., 2002, 2003). Tal como se explicará más adelante, la aparición de compuestos capaces de bloquear al AT1-R (ARBs) como alternativa terapéutica al tratamiento de enfermedades cardiovasculares, fue uno de los mayores logros en la historia de los tratamientos anti-hipertensivos.

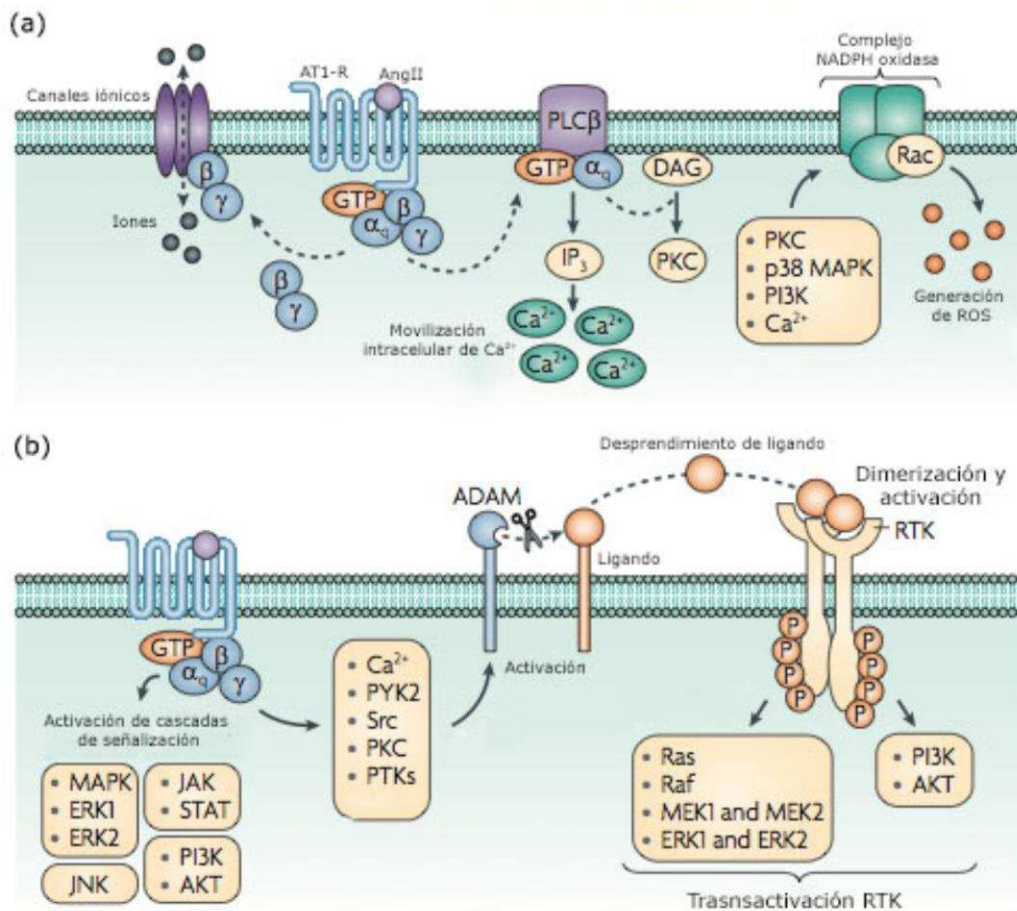


Figura I-7. Principales vías de señalización mediadas por AngII/AT1-R. (a) Movilización de Ca²⁺ y generación de ROS; **(b)** Activación de diversas vías de señalización: MAPKs, PI3K/AKT, JAK-STAT, transactivación de RTK (ej., EGFR). (Adaptado de Ameer et al., 2010).

Al igual que el AT1-R, la estructura molecular del AT2-R pertenece a la de la superfamilia de receptores de 7 pasos transmembrana acoplados a proteínas G (Inagami, 1999; Lazard et al., 1994). Su ADNc codifica para una proteína de 363 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 41 kDa, y su gen está formado por 3 exones. El AT2-R comparte sólo el 34% de homología en su secuencia con el AT1-R (Ichiki and Inagami, 1995). Con respecto a su estructura proteica, este receptor contiene 5 potenciales sitios de glicosilación en el extremo amino terminal de su dominio extracelular. Entre las principales diferencias con el AT1-R, el AT2-R presenta una Lys conservada, la cual es importante en la interacción ligando-receptor. Asimismo, contiene un potencial sitio de fosforilación para la PKC en el segundo *loop* intracelular, y 3 en el extremo C-terminal de su dominio citoplasmático (Carey et al., 2000).

El AT2-R se expresa en altos niveles en el tejido fetal, lo cual sugiere que éste cumple un papel en el desarrollo y diferenciación tisular (De Gasparo, 2002; Gross

et al., 2004). Si bien su expresión en el tejido adulto en condiciones normales es baja, el AT2-R se encuentra expresado en procesos inflamatorios y tejidos lesionados, como por ejemplo ante un daño vascular o neuronal (Gallinat et al., 1998), un infarto de miocardio (Busche et al., 2000) o una isquemia cerebral (Li et al., 2005b). Por otro lado, actualmente es bien aceptado que el AT2-R forma parte del “eje protector del RAS”, con una importante participación en los fenómenos de protección y regeneración tisular (Steckelings and Unger, 2012).

La estimulación del AT2-R tras la unión de AngII, gatilla al menos tres vías de señalización diferentes, a través de las cuales promueve: la activación de diversas fosfatasa, la activación de fosfolipasa A2, la producción de cGMP, NO, la inhibición de la actividad del factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Rompe et al., 2010).

3.3.4 Eje ECA2/Ang-(1-7)/MAS-R.

3.3.4.1 Enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2).

Descubierta en el año 2000, ECA2 es una proteína integral de membrana tipo I, perteneciente a la familia de las zinc metaloproteinasas. Ésta se encuentra formada por un dominio extracelular N-terminal, que contiene el sitio catalítico, y por un dominio intracelular C-terminal. Al igual que ECA, el sitio catalítico de ECA2 se encuentra expuesto (ectoenzima) a péptidos vasoactivos circulantes (Warner et al., 2005). Con respecto a su estructura génica, Tipnis et al. descubrieron que el gen de ECA2 contiene 18 exones (Tipnis et al., 2000). De acuerdo a los hallazgos de Donoghue et al., los dominios catalíticos de ECA2 y ECA presentan un 42% de homología (Donoghue et al., 2000). No obstante, ambas enzimas difieren en la especificidad de sustrato. A diferencia de ECA, ECA2 es una monocarboxipeptidasa capaz de remover el amino ácido Leu del extremo C-terminal de AngI, generando Ang-(1-9) en lugar de AngII (Donoghue et al., 2000).

Tal como se explicó anteriormente, a partir del clivaje de Ang-(1-9), se genera Ang-(1-7). Sin embargo, la síntesis de Ang-(1-7) directamente a partir del clivaje del residuo Phe del extremo C-terminal de AngII, resulta fisiológica- y biológicamente más relevante (Vickers et al., 2002). La eficiencia catalítica de la ECA2 humana, es 400 veces más alta con AngII como sustrato que con AngI. Fue a partir de dicho descubrimiento que la diferencia en la actividad catalítica de ambas enzimas se hizo más evidente (Rice et al., 2004; Vickers et al., 2002). En este contexto, resulta interesante destacar que, la actividad de ECA2, es inhibida por EDTA pero no por iECAs (tales como captopril y lisinopril) (Tipnis et al., 2000; Turner et al., 2002).

Inicialmente, se reportó que ECA2 se expresaba únicamente en corazón, riñón y testículos (Tipnis et al., 2000). No obstante, se ha demostrado que, si bien con un perfil de expresión menos ubicuo que ECA, esta enzima se encuentra altamente expresada en diversos tejidos, principalmente en los pulmones (Doobay et al., 2007; Gembardt et al., 2005; Kuba et al., 2006).

Estudios reciente sugieren una asociación entre la actividad de ECA2 y los niveles de la presión sanguínea (Patel et al., 2014), habiéndose demostrado el rol antihipertensivo de dicha enzima en varios modelos pre-clínicos (Rentzsch et al., 2008; Yamazato et al., 2007). Al igual que ECA, las variaciones genéticas de ECA2 en la población humana, se correlacionan con la susceptibilidad a padecer afecciones tales como la hipertrofia ventricular (Lieb et al., 2006) y la enfermedad de arterias coronarias (Yang et al., 2006). Asimismo, se ha observado que, tanto en el humano, como en rata y en ratón (Burrell et al., 2005), el infarto de miocardio produce un incremento en la expresión del ARNm de ECA2, induciendo mecanismos de remodelación cardíaca. Por el contrario, la pérdida o inhibición de ECA2, resulta en un empeoramiento de la función cardíaca, un aumento en el tamaño del infarto, activación de metaloproteinasas de matriz e inflamación (Kassiri et al., 2009; Kim et al., 2010).

Es evidente que la ECA2 presenta un alto potencial terapéutico para enfermedades cardiovasculares y renales. En consecuencia, se han sintetizado diversos activadores de dicha enzima, así como una variante recombinante humana de la misma.

3.3.4.2 El receptor de Ang-(1-7): MAS-R.

Mas fue originalmente descrito como un protooncogen, debido a su capacidad para inducir tumorigénesis en ratones inmunosuprimidos (*nude*). El análisis de la secuencia del ADNc del gen *Mas* humano, reveló un marco de lectura que codifica para una proteína de 325 aminoácidos (Young et al., 1986). El gen *Mas* codifica para un receptor de membrana asociado a proteínas G y, por ende, está formado por 7 dominios transmembrana hidrofóbicos, con sus extremos amino y carboxi-terminal hidrofílicos. Asimismo, presenta una gran similitud con la subfamilia de receptores hormonales (Probst et al., 1992). Por otro lado, el gen *Mas* se aisló y caracterizó en rata y ratón (Metzger et al., 1995; Young et al., 1988), presentando ambos un 97% de homología en su secuencia aminoacídica. A su vez, se encontró que la variantes humana y murina tienen una identidad del 91%, lo cual indica que el *Mas* se encuentra altamente conservado, con excepción de su dominio amino-terminal. En ratón, se ha detectado una mayor expresión del MAS-R en corazón,

riñón, pulmón, hígado, baso y lengua, observándose también su expresión en cerebro entre otros (Metzger et al., 1995; Villar and Pedersen, 1994).

Años más tarde de su descubrimiento, se demostró que, ratones transgénicos que sobreexpresaban el MAS-R de manera ubicua y especialmente en cerebro, no desarrollaban tumor, confirmando así que el gen *Mas per se* no presenta actividad oncogénica (Alenina et al., 2008). Por lo tanto, la mayor parte de los estudios subsiguientes, se focalizaron en dilucidar el rol fisiológico del Mas-R, así como las vías de señalización en las que éste participa.

Si bien las primeras investigaciones ya definían al MAS-R como un receptor de angiotensinas (Jackson et al., 1988), el primer vínculo con Ang-(1-7) fue establecido por Santos et al. recién en el año 2003. Los autores demostraron mediante ensayos de *binding* que, a diferencia de en ratones *wild type*, en ratones *KO* para el gen *Mas* no había interacción de Ang-(1-7). Por el contrario, observaron que en ratones deficientes para AT1-R o AT2-R, la unión de Ang-(1-7) se conservaba. Dichos resultados, revelaron no sólo que la interacción de Ang-(1-7) con AT1-R o AT2-R es limitada, sino que además dicho péptido se une preferentemente al MAS-R. Estudios posteriores, confirmaron la existencia de sitios de alta afinidad para Ang-(1-7) en el MAS-R (Santos et al., 2003). Por otro lado, años antes los mismos autores fueron los primeros en desarrollar un antagonista selectivo para el MAS-R: el D-Ala7-Ang-(1-7), conocido como A779 (Santos et al., 1994). Estos hallazgos permitieron publicar diversos estudios funcionales, en los que se confirmaba que los efectos inducidos por Ang-(1-7), eran mayormente mediados por el MAS-R (Bader, 2013; Wang et al., 2012).

Se ha reportado que, la interacción de Ang-(1-7) con el MAS-R, activa diversas vías de señalización (**Figura I-8**). Dias-Peixoto et al., demostraron que Ang-(1-7) es capaz de activar la vía de Pi3K/Akt, resultando en la activación de la enzima óxido nítrico sintasa 3 (eNOS3) y la síntesis de NO/cGMP (Dias-Peixoto et al., 2008). Finalmente, cGMP inhibe la translocación al núcleo del factor de transcripción NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), en donde normalmente aumenta la síntesis de transcritos pro-hipertróficos, al ser estimulado por AngII. Asimismo, mediante el aumento de la actividad de eNOS y NO, Ang-(1-7) modula la concentración celular de Ca²⁺, previniendo los efectos patológicos de la acumulación de dicho ion en el citoplasma (Dias-Peixoto et al., 2008). Por otro lado, el eje Ang-(1-7)/MAS-R también participa en la regulación de la fibrosis cardíaca, a través de la regulación de genes que codifican para citoquinas inflamatorias, mitigando así el daño oxidativo (Bader, 2013; Clarke et al., 2013; Li et al., 2009). A su vez, Ang-(1-7) inhibe la actividad de NFAT a través de la

modulación de la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 ($GSK3\beta$), previniendo su inhibición por AngII. $GSK3\beta$ fosforila NFAT en el núcleo y promueve su exportación del núcleo y, por ende, es considerada un potencial inhibidor de dicho factor de transcripción (Gomes et al., 2012). Por último, a través de su receptor MAS-R, Ang-(1-7) inhibe la proliferación y migración de células del músculo liso vascular (VSMC). Dichos efectos, son producidos por diferentes mecanismos, que incluyen la liberación de prostaglandinas, resultando en la inhibición de las vías de ciclooxigenasas y MAPKs (Zhang et al., 2010).

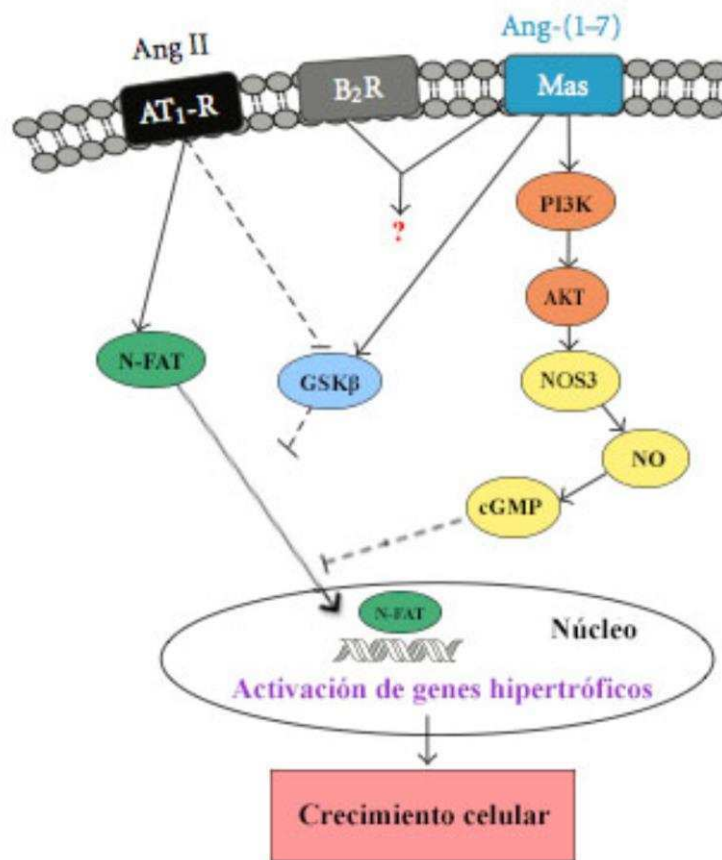


Figura I-8. Vías de señalización activadas por Ang-(1-7)/MAS-R en cardiomiocitos. Ang-(1-7) activa la vía PI3k/AKT/NOS3, dando lugar a la generación de NO y producción de cGMP. La activación de esta vía, culmina con la inhibición de la translocación de NFAT, inducida por AngII. Aún se desconocen las consecuencias del *crossstalk* de Ang-(1-7)/MAS-R con B2R, para la función de los cardiomiocitos (?). →= activación; - -|= inhibición. (Adaptado de Gomes et al., 2012).

Recientemente, se han publicado diversos trabajos, focalizados en las principales acciones de este nuevo eje del RAS en los sistemas cardiovascular y renal. Sin embargo, al igual que el eje ECA/AngII/AT1-R, éste posee efectos pleiotrópicos, actuando a nivel de otros sistemas u órganos, tales como el cerebro,

los pulmones, el hígado, los órganos sexuales y el páncreas. Entre las principales funciones de Ang-(1-7), se destacan:

a) *Reducción de los niveles de fibrosis*: a través de la apoptosis de fibrocitos, y la disminución de los niveles de colágeno (Wang et al., 2012), y de la síntesis de hidroxiprolina y TGF- β (Pereira et al., 2007). Además de a nivel cardíaco, Ang-(1-7) es capaz de disminuir la fibrosis pulmonar, hepática y renal.

b) *Efecto anti-inflamatorio*: disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) de macrófagos tratados con Ang-(1-7) (Souza and Costa-Neto, 2012), así como el número de neutrófilos (da Silveira et al., 2010) y la deposición de lípidos (Lovren et al., 2008).

c) *Efecto anti-proliferativo y anti-angiogénico*: ambos convierten a Ang-(1-7) en una alternativa potencial para el tratamiento antitumoral, tal como se discutirá más adelante. Las propiedades anti-angiogénicas de Ang-(1-7), se asocian con una disminución en la síntesis del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y del factor de crecimiento placentario (PIGF) (Krishnan et al., 2013a). Recientemente, se ha reportado que Ang-(1-7) poseería efectos anti-metastásicos en células de cáncer de pulmón y próstata (Krishnan et al., 2013b).

d) *Modulación de múltiples funciones del SNC*: además de ser un neuromodulador crítico de los barorreflejos cardíacos, Ang-(1-7) presenta efectos psicotrópicos. Principalmente, regula los procesos asociados al aprendizaje y la memoria (Lazaroni et al., 2012), aumentando la potenciación a largo plazo (LTP) (Hellner et al., 2005). Asimismo, confiere protección cerebral, disminuyendo el riesgo de infartos o isquemias (Zhang et al., 2008).

e) *Regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos*: aumenta los niveles de lipólisis (Santos et al., 2008), incrementa la incorporación de glucosa (Liu et al., 2012), y disminuye la resistencia a la insulina (Giani et al., 2009), protegiendo a las células del estrés oxidativo generado por dicho proceso.

f) *Efectos en el sistema reproductor*: promueve la ovulación (Goncalves et al., 2012) y la espermatogénesis (Leal et al., 2009), así como la síntesis de esteroides sexuales.

Hace unos años, comenzó a aceptarse la hipótesis de que el eje ECA2/Ang-(1-7)/MAS-R contrarresta la mayor parte de las acciones deletéreas del eje ECA/AngII/AT1-R, especialmente en condiciones patológicas (Ferreira and Santos,

2005). De esta forma, se han desarrollado agonistas del MAS-R, con el objetivo de estudiar el eje y su implicancia a nivel clínico.

3.4 Antagonistas del RAS: aplicaciones clínicas.

Anteriormente, se hizo hincapié en la aparición del concepto del RAS local o tisular, el cual no sólo cumple un rol fisiológico en un determinado órgano o sistema, sino que además se lo asocia con procesos inflamatorios, fibrosis y daño de su órgano blanco. A su vez, el RAS es un sistema complejo y, por ende, posee múltiples sitios capaces de ser intervenidos farmacológicamente. Por esta razón, el bloqueo del RAS es considerado uno de los mayores avances en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, disminuyendo la mortalidad y mejorando la calidad de vida de pacientes que padecen hipertensión, enfermedad renal crónica (CKD), infarto de miocardio o insuficiencia cardíaca (Romero et al., 2015). Las ventajas del bloqueo del RAS, han sido demostradas desde los primeros ensayos clínicos, convirtiéndose dicho bloqueo en un tratamiento de primera línea, principalmente para las patologías mencionadas. Dentro de los antagonistas del RAS clásico, se encuentran aquellos compuestos que actúan sobre el eje ECA/AngII/AT1-R. No obstante, debido a la expansión del sistema y al surgimiento de un nuevo eje no canónico, el número de potenciales blancos terapéuticos crece constantemente.

3.4.1 Antagonistas del RAS clásico.

Existen tres grupos establecidos de drogas que inhiben el eje clásico del RAS: los inhibidores de la ECA (iECA), los bloqueantes del receptor AT1-R de AngII (ARBs) y los inhibidores directos de la renina (DRIs) (Romero et al., 2015) (**Figura I-9**). A pesar de los avances importantes alcanzados con estos agentes, los iECA y ARBs sólo alcanzaron disminuir en un 20% el riesgo relativo de la progresión de enfermedades cardiovasculares, comparado con terapias, cuyos blancos de acción son diferentes al RAS (Brenner et al., 2001; INVESTIGATORS, 2000; Lewis et al., 2001). Asimismo, no hay datos que demuestren que tanto los ARBs como los iECA poseen efectos beneficiosos en la prevención primaria de patologías renales y cardíacas (Romero et al., 2015). Por lo tanto, hoy en día se le da mayor prioridad a la incorporación de nuevos agonistas y antagonistas que involucren a la cascada del RAS en su totalidad, de manera de mejorar la acción de las drogas clásicas ya establecidas

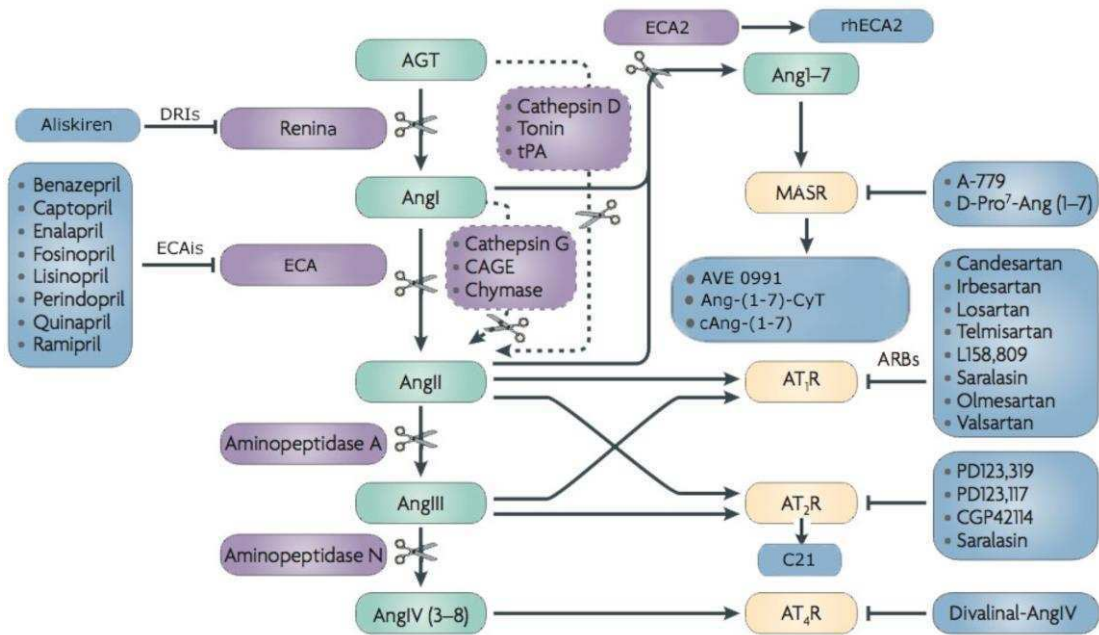


Figura I-9. Sitios de acción de los principales agonistas y antagonistas farmacológicos del RAS. Los dos grupos más estudiados son los iECA (generalmente llamados “-prils”), que bloquean la acción de la ECA; y los ARBs, (también llamados “-sartans”), que bloquean la interacción AngII/AT1-R. La expansión del RAS, y principalmente el descubrimiento del eje ECA2/Ang-(1-7)/MAS-R, permitió el desarrollo de nuevas drogas que alteran la actividad del sistema (C21, rhECA2, AVE 0991, Ang-(1-7)-CyT, cAng-(1-7)). (Adaptado de Ameer et al., 2010).

3.4.1.1 Inhibidores de la ECA (iECA).

Los primeros estudios clínicos del primer iECA oral, captopril, datan de mediados de los años 70. Desde el comienzo se demostró que dicho agente, presenta propiedades antihipertensivas y mejora el estado clínico de pacientes con insuficiencia cardíaca (Dzau et al., 1980).

Actualmente, más de 10 iECA se encuentran disponibles a nivel mundial. Los años de uso confirman que, dichas drogas no sólo son seguras, sino que además presentan muy buena tolerancia.

3.4.1.2 Antagonistas del receptor AT1-R (ARBs).

Los ARBs son compuestos no peptídicos activos por vía oral, capaces de bloquear de manera específica al receptor AT1 (AT1-R). Éstos fueron descubiertos años después de la aparición de los iECA, y el primero de ellos, **losartan**, estuvo disponible para uso clínico en los años 90 (Romero et al., 2015). La buena tolerancia y la efectividad de los ARBs como agentes antihipertensivos, ha sido demostrada en reiterados ensayos. En uno de ellos, *LIFE (Losartan Intervention for Endpoint)*, se observó que, en el subgrupo de pacientes que presentaban

hipertensión sistólica aislada, las tasas de mortalidad y morbilidad por hipertensión disminuían un 25% más en pacientes tratados con losartan que aquellos que recibieron el β -bloqueante atenolol. Asimismo, dichos índices se reducían a un 40% para accidentes cerebro vasculares (Dahlof et al., 1997). Los ARBs proveen, además, protección cardiovascular y renal, siendo eficaces para el tratamiento de pacientes con insuficiencias cardíacas, y previniendo la enfermedad renal crónica en pacientes con diabetes tipo 2 (Viazzi et al., 2016). Por otro lado, otros ensayos clínicos tales como *IDNT (Irbesartan type 2 Diabetic Nephropathy)* e *IRMA II (the Irbesartan Micro-Albuminuria II)*, demostraron los efectos renoprotectores del ARB **irbesartan**, en comparación con las terapias convencionales (Igi?? and ??krbi??, 2014).

Actualmente, existen 9 ARBs para uso clínico. Si bien en general las indicaciones para el uso de ARBs son las mismas que para los iECA, los ARBs presentan menos efectos adversos (Toh et al., 2012). Principalmente, éstos no provocan la acumulación de bradiquinina, y tienen la habilidad de activar al AT₂-R, favoreciendo la vasodilatación en vasos sanguíneos pequeños y otorgándole al paciente una protección cardíaca y renal adicional (Dézsi CA, 2016). Por último, al igual que los iECA, el uso de ARBs incrementa los niveles de AngII como sustrato de ECA2, estimulando el eje ECA2/Ang-(1-7)/Mas-R, lo cual puede resultar beneficioso desde el punto de vista clínico (Romero et al., 2015).

3.4.1.3 Inhibidores directos de la renina (DRIs).

En el año 2007, se incorpora a la lista de inhibidores del RAS el primer DRI, Aliskiren, aprobado dicho año por la *FDA (US Food and Drug Administration)* y la *EMA (European Medical Agency)* para el tratamiento contra la hipertensión. Éste es el primer DRI activo por vía oral y, al ser una molécula no peptídica, presenta mayor biodisponibilidad y una mayor vida media que los DRIs de primera generación (Jensen et al., 2008).

Tras unirse al sitio catalítico de la renina, Aliskiren bloquea la cascada proteolítica del RAS en su punto de origen. En consecuencia, y a diferencia de los iECA y ARBs, inhibe directamente la actividad de la renina plasmática. En efecto, numerosos datos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, junto con una mayor eficacia antihipertensiva y un perfil de alta tolerancia similar al placebo, sostienen el alto potencial de esta droga en la protección renal y cardiovascular (Staessen et al., 2006). Sin embargo, el desarrollo clínico de Aliskiren no fue promisorio como se esperaba, reduciendo eventualmente su rol en el panorama terapéutico actual.

4. RAS y carcinogénesis: de la investigación básica a la clínica.

El cáncer se encuentra dentro de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012 se reportaron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes por cáncer (Stewart and Wild, 2014). Las estrategias terapéuticas, generalmente incluyen la combinación de una intervención quirúrgica, radioterapia y quimioterapia. Asimismo, se han utilizado inhibidores de la angiogénesis o disruptores vasculares para combatir el tumor y las metástasis.

No obstante, existen evidencias recientes que sugieren una vía alternativa para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra el cáncer. Diversos mecanismos parácrinos a nivel tisular, han sido implicados en tumorigénesis (Ager et al., 2008). Entre ellos, el RAS se expresa en la mayor parte de los tejidos a nivel local, tal como se describió previamente. Estudios experimentales y epidemiológicos sugieren que el RAS podría contribuir a la regulación parácrina de varios tipos de tumores. Se ha reportado la expresión diferencial de distintos componentes del sistema en tumores de cerebro, pulmón, colon, riñón, hígado, estómago (Ager et al., 2008; Rosenthal and Gavras, 2009), páncreas (Fujimoto et al., 2001), mama (De Paepe et al., 2002), próstata (Uemura et al., 2003), piel (Takeda and Kondo, 2001), cérvix (Kikkawa et al., 2004), ovarios (Suganuma et al., 2005).

4.1 Rol del RAS en el desarrollo y progresión tumoral.

La transformación maligna se encuentra asociada a: angiogénesis sostenida, evasión de la apoptosis, alteraciones en las señales de arresto celular, invasión tisular y metástasis, y potencial replicativo ilimitado (Hanahan, 2000). Si bien el RAS es capaz de regular todas estas capacidades, los efectos más relevantes ocurren a nivel de la angiogénesis, invasión, migración, metástasis, apoptosis y proliferación (George et al., 2010). A continuación, se describe la participación del RAS en algunos de estos aspectos.

4.1.1 Activación del RAS: efectos sobre los procesos de migración, invasión y metástasis.

De acuerdo a lo reportado en estudios en humanos, la capacidad de células transformadas para migrar, invadir y metastatizar, se vincula tanto a cambios genotípicos como a una activación exacerbada de los componentes del RAS.

En cáncer de estómago, el polimorfismo I/D de ECA influye sobre el comportamiento metastásico (Röcken et al., 2005) y, junto con el aumento en la expresión de AT1-R, se correlaciona positivamente con la diseminación nodal (Röcken et al., 2007). En tumores ováricos, la sobreexpresión de AT1-R se correlaciona fuertemente con el grado de invasividad (Suganuma et al., 2005). A su vez, en un estudio retrospectivo de fase II en cáncer colorrectal, aquellos pacientes que recibieron iECA, mostraron una disminución en el número de metástasis (J.H. et al., 2007). Por otro lado, ARBs y iECA demostraron su eficacia para reducir el grado de metástasis, en diferentes modelos preclínicos. En un modelo murino de metástasis de pulmón, la administración de candesartan, redujo significativamente la carga metastásica (Miyajima et al., 2002); mientras que captopril disminuyó el volumen tumoral y fue asociado con la disminución de metástasis ganglionares, en un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Attoub et al., 2008). A pesar de que existen evidencias que muestran que el RAS cumple un rol en los procesos de migración, invasión y metástasis, dicha respuesta no es universal a todos los tipos y subtipos de tumores (George et al., 2010).

Por último, los procesos fibróticos, tales como el aumento de colágeno I en el tejido tumoral, o bien la transición epitelio mesenquimal (TEM) de células del huésped y/o células tumorales, se asocian a un aumento de la invasividad (Gressner et al., 2007). AngII es capaz de aumentar la expresión de TGF- β 1 entre otras citoquinas, lo cual se asocia a la acumulación de proteínas fibrosas de matriz (Weber et al., 1999; Yang et al., 2005). A su vez, AngII incrementa la expresión de la α -actina de músculo liso (α -SMA), y disminuye la de la cadherina epitelial (E-cadh), ambas moduladoras de la TEM (Liu et al., 2007). Dado que la fibrosis inducida por el tumor favorece la síntesis de factores asociados al crecimiento y la angiogénesis, su inhibición posiblemente active mecanismos de retroalimentación positiva, que impidan tanto el crecimiento tumoral como la metástasis.

4.1.2 El RAS modula los procesos inflamatorios y la angiogénesis tumoral.

La interacción de AngII, principalmente con el AT1-R, promueve la señalización asociada a procesos inflamatorios y angiogénesis, dando lugar a la activación río abajo de factores de transcripción, tales como NF- κ B, miembros de la familia de STAT, y el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) (Marrero et al., 1995; Pagé et al., 2002; Ruiz-Ortega et al., 2000). Éstos, son los encargados de regular genes que codifican factores de crecimiento y citoquinas involucradas en la progresión tumoral (Haura et al., 2005; Karin, 2006; Pouyssegur et al., 2006). Existen evidencias, que demuestran que VEGF es crucial para la angiogénesis

tumoral mediada por RAS. De hecho, el bloqueo del RAS se vincula generalmente a una disminución de la expresión de dicho factor (Egami et al., 2003; Kosaka et al., 2007). Por otro lado, se ha demostrado que diversos tipos de células inflamatorias, expresan componentes del RAS en el microambiente tumoral. Éstas responden a la estimulación con AngII, aumentando la secreción de IL-1 α , IL-6, IL-8, la proteína quimiotáctica de monocitos - 1 (MCP-1), y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), potenciando así el ambiente inflamatorio y los procesos angiogénicos (George et al., 2010) **(Figura I-10)**. Los macrófagos asociados a tumores, por ejemplo, presentan una alta expresión del AT1-R. La liberación de citoquinas por parte de los mismos, induce angiogénesis y facilita el crecimiento tumoral y la metástasis. En un modelo de melanoma, los sitios de expresión de AT1-R co-localizan con los de la proteína VEGF. Por lo tanto, es posible que AngII estimule la infiltración de macrófagos y la angiogénesis mediada por ellos (Egami et al., 2003).

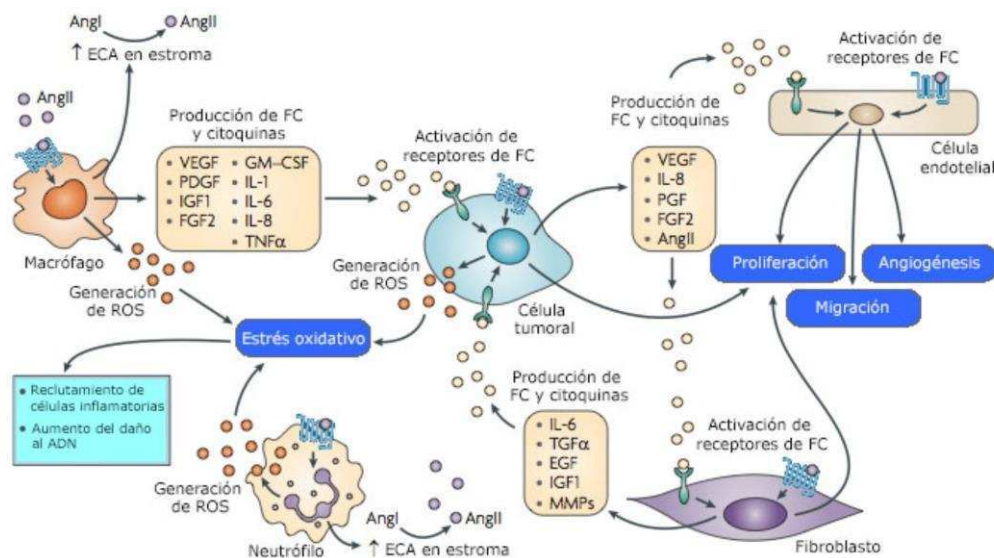


Figura I-10. Vías de señalización del RAS en células estromales y su efecto sobre el microambiente y la progresión tumoral. A través del AT1-R, la AngII sintetizada por el RAS local, regula la secreción de factores de crecimiento (FC) y citoquinas al microambiente tumoral, favoreciendo el crecimiento de fibroblastos y de células endoteliales, así como la proliferación de células tumorales. En un contexto hipóxico e inflamatorio, macrófagos y neutrófilos generan especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a la estimulación con AngII, incrementando la señalización del RAS. Esto favorece el crecimiento celular, y contribuye con los procesos de proliferación y angiogénesis. (Adaptada de Amee et al., 2010).

Se ha demostrado en estudios *in vivo*, la eficacia de los ARBs para disminuir la angiogénesis tumoral. Uno de ellos, el candesartan disminuye la expresión de VEGF en tumores mamarios xenotransplantados, inhibiendo así el crecimiento tumoral y la angiogénesis de manera dosis dependiente (Chen et al., 2013). El mismo efecto se observó en tumores de próstata xenotransplantados, luego de la administración

de dosis clínicamente relevantes de dicho antagonista (Alhusban et al., 2014). Otro de los ARBs más estudiados, el losartan, en combinación con el agente quimioterapéutico gemcitabina, fueron capaces de inhibir la expresión de VEGF y la angiogénesis tumoral en un modelo murino de cáncer de páncreas (Kim et al., 2014; Noguchi et al., 2009).

Por el contrario, estudios *in vivo* recientes, sugieren que Ang-(1-7) posee propiedades anti-angiogénicas. Una de las principales evidencias, fue reportada por Tallant y colaboradores, quienes demostraron que el tratamiento con Ang-(1-7) disminuye significativamente el crecimiento tumoral y la densidad de microvasos, en un modelo de xenotransplante murino de cáncer de pulmón. Dichos efectos, se asociaron a una disminución de la expresión de VEGF (Soto-Pantoja et al., 2009), probablemente mediada a través de la inhibición de la señalización de ERK dependiente de MAS-R (Gallagher and Tallant, 2004) o de ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Menon et al., 2007).

Finalmente, el balance entre los niveles de Ang-(1-7) y AngII sería relevante a la hora de determinar si un tumor adquirió o no un fenotipo angiogénico.

4.1.3. Implicancia clínica.

Se reportaron tres estudios retrospectivos caso-control, en los cuales se analizó la correlación entre la administración de un iECA y la incidencia de cáncer de esófago, páncreas y colon, en un grupo de 483.733 veteranos norteamericanos. En todos los estudios, se asoció a los iECA con una disminución en el riesgo de padecer cualquiera de los tres tipos de neoplasias examinadas (Lang, 2006). No obstante, los inhibidores del RAS no sólo cumplirían un rol importante en la prevención, sino también en la supervivencia de pacientes oncológicos. En un estudio de 287 pacientes con un grado avanzado de cáncer de pulmón de células no pequeñas, que recibían una quimioterapia de primera línea con cis-platino (CDDP), se observó que aquellos a los que se les administró algún iECA o ARB, presentaron una supervivencia 3.1 meses mayor que las que no la recibieron (Wilop et al., 2009). En este sentido, se sugiere que el incremento en la generación de ROS por el uso de CDDP, favorece la sobre-expresión de AT1-R así como la síntesis de VEGF (Miyajima et al., 2015). De manera similar, se evaluó retrospectivamente la terapia combinada de gemcitabina e iECA o ARB, utilizando datos de 155 pacientes con cáncer de páncreas avanzado (Nakai et al., 2010). En ambos estudios, se reportó que la inhibición del RAS, combinada con un agente quimioterapéutico, mejora el estado clínico del paciente. Por último, Keizman et al., demostró que la

inhibición del RAS mejoraría el pronóstico clínico del tratamiento con sunitinib, en carcinomas renales metastásicos (Keizman et al., 2011).

Con respecto a estudios clínicos, en el año 2009, Petty et al. llevaron a cabo un ensayo de fase I, en el cual estudiaron el uso de Ang-(1-7) como droga anti-angiogénica de primera línea, en pacientes con diferentes tipos de tumores sólidos refractarios a la terapia convencional (Petty et al., 2009). Los resultados fueron alentadores/promisorios, dado que de los 18 pacientes estudiados, 1 desarrolló una disminución del 19% en el tamaño del tumor, mientras que 3 de ellos mostraron mejoras clínicas y estabilización de la enfermedad. El mismo grupo, reportó hace dos años que en otros tres ensayos clínicos, Ang-(1-7) resultó clínicamente beneficiosa en pacientes oncológicos, ya que fue bien tolerada y presentó efectos secundarios muy limitados (Gallagher and Tallant, 2004).

Por otro lado, un ensayo de fase II examinó la eficacia y toxicidad de una terapia combinada de tres agentes con efectos sinérgicos entre sí: citemidina, meloxicam (inhibidor de la COX-2) y un inhibidor del RAS (candesartan o perindopril), junto con interferón- α (terapia I-CCA), en pacientes con carcinomas renales metastásicos (Tatokoro et al., 2011). Los resultados fueron favorables, habiéndose demostrado una baja toxicidad en los pacientes, y una mejor tasa de supervivencia en aquellos que recibieron la terapia combinada. Cabe destacar, que ninguno de estos pacientes recibió una terapia dirigida luego del estudio. Asimismo, la eficacia de la terapia I-CCA fue comparable a cualquier terapia dirigida, pudiendo ser considerada como tratamiento de primera línea en este tipo de neoplasias. No obstante, se necesitan ensayos clínicos aleatorios, internacionales y a gran escala para poder confirmar estos resultados.

4.2 RAS y tumorigénesis mamaria.

4.2.1 Expresión del RAS en tejido mamario.

Tal como se mencionó anteriormente, se han publicado trabajos que muestran la expresión de un RAS tisular, tanto en la glándula mamaria normal como en tejido tumoral (Tahmasebi et al., 2006; Vinson et al., 2012). Se detectó un aumento en los niveles de ARNm de dicho receptor en lesiones hiperplásicas, en carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y en carcinoma ductal invasivo (CDI) (Greco et al., 2002). En cuanto a AT2-R, poco se conoce acerca de la asociación de dicho receptor con el cáncer de mama. Sin embargo, De Paepe et al. observaron un aumento en la expresión de dicho receptor, tanto en hiperplasia como en tumores mamarios. Asimismo, detectaron que los niveles de ARNm y proteína de dicho receptor son

bajos en tejido normal, pero aumentan de manera significativa en el tejido tumoral (De Paepe et al., 2002). Con respecto a los demás péptidos del RAS clásico, también se ha observado una expresión diferencial de los mismos en condiciones patológicas. La expresión del ARNm de pro-renina, fue significativamente menor en carcinoma que en tejido normal. En condiciones fisiológicas, éste se encontraba distribuido mayormente en fibroblastos y tejido conectivo de los ductos. Por el contrario, los niveles proteicos de pro-renina se hallaron principalmente en células mioepiteliales. Sin embargo, en condiciones patológicas avanzadas, en las que el mioepitelio se pierde, la expresión proteica de pro-renina se concentró en los fibroblastos, con niveles muy bajos en el epitelio. De la misma manera, los ARNm de AGT y ECA también se vieron reducidos en tumores con respecto a su expresión en tejido normal (Tahmasebi et al., 2006).

La expresión de los componentes del eje ECA2/Ang-(1-7)/MAS-R, también ha sido demostrada, tanto en tejido mamario normal como tumoral. Hamer et al., encontraron por *RT-qPCR*, que ECA2 se expresa en la mayor parte de las líneas celulares y tejidos humanos, incluyendo la glándula mamaria (Harmer et al., 2002). En cuanto al MAS-R, un estudio publicado recientemente, en el cual se estudiaba el rol de dicho receptor en 132 casos de CDI, reportó una expresión atenuada del MAS en dichos tejidos, en comparación con el alto nivel encontrado en tejido mamario benigno (Luo et al., 2015). Por el contrario, resulta interesante destacar que, de los casos analizados, aproximadamente un 10% eran tumores triple negativos, en los cuales se retuvo la expresión del MAS-R. Asimismo, dicha expresión se halló principalmente en células mioepiteliales o basales.

4.2.2 Rol del RAS en tumores de mama.

Estudios funcionales indican que, la sobreexpresión de AT1-R en células de cáncer de mama, promueven el crecimiento, migración e invasión celular *in vitro*, y el crecimiento tumoral y formación de metástasis *in vivo* (Rhodes et al., 2009). Se ha demostrado recientemente que, el estímulo con AngII de células MCF-7 que sobreexpresan el AT1-R, induce de manera significativa la proliferación celular. Asimismo, losartan presenta un efecto inhibitorio en la viabilidad celular inducida por AngII, en las células MCF-7 que sobreexpresan AT1-R con respecto a las células *wild type (wt)* (Oh et al., 2016). Por otro lado, el mismo grupo xenotransplantó tanto la línea parental como la que sobreexpresa AT1-R en ratones *nude*. De esta forma, demostraron que el bloqueo del AT1-R retarda el crecimiento tumoral, y disminuye significativamente el número de células Ki-67 positivas (Oh et al., 2016).

Por otro lado, al igual que en otros tipos de tumores, se ha reportado una correlación entre el aumento en la expresión AngII y el de VEGF, en líneas celulares de cáncer de mama invasivas (Chen et al., 2013; Jethon et al., 2012). Dicho efecto, fue inhibido, luego del tratamiento con losartan, resultando en una disminución de los niveles de angiogénesis (Jethon et al., 2012).

Las vías de señalización del AT1-R, también interactúan con factores de crecimiento en células tumorales mamarias. La activación de la cascada AT1R/PI3K/Akt/NF- κ B (Zhao et al., 2014), induce la migración celular; mientras que la activación de ERKs promueve la proliferación y crecimiento de células tumorales (Greco et al., 2003).

Diversos estudios han documentado la presencia de altos niveles de expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en diversos tipos de tumores, incluyendo tumores de ovario, próstata, mama y melanoma (Roomi et al., 2009). Ambas gelatinasas participan de la degradación de la MEC y, por ende, favorecen la invasión tumoral y la formación de metástasis. Particularmente en cáncer de mama, Rodrigues-Ferreira et al. demostraron que AngII es capaz de incrementar la expresión génica y actividad de MMP-2 y MMP-9 en células tumorales mamarias (Rodrigues-Ferreira et al., 2012). Asimismo, recientemente se halló que los niveles de MMP-9, eran considerablemente mayores en tumores que sobreexpresaban AT1-R (Oh et al., 2016).

Por el contrario, Cook et al., observaron que Ang-(1-7) produjo una disminución significativa de los depósitos de colágeno I, reduciendo la fibrosis tumoral (Cook et al., 2010). Se sugiere que la reducción de los niveles de colágeno I mediada por Ang-(1-7), participan en la disminución de la proliferación tumoral, así como en la inhibición de metástasis. Por otro lado, la deposición de fibronectina en el estroma de tumores mamarios, se correlaciona positivamente con el grado y tamaño del tumor, así como con la invasión ganglionar linfática (Ioachim et al., 2002). En este sentido, se ha reportado una disminución del 40% en los niveles de fibronectina en fibroblastos aislados de tumores mamarios, previamente tratados con Ang-(1-7). Además, se observó una disminución significativa en la fibrosis perivascular de tumores BT-474, en ratones tratados con Ang-(1-7) versus el control sin tratar (Cook et al., 2010). De esta forma, se postula que Ang-(1-7) podría atenuar la deposición de MEC, la invasión tumoral y la proliferación, reduciendo la síntesis de fibronectina.

Debido a la importancia de la señalización del ER en el cáncer de mama, es relevante considerar su interacción con el RAS. Existen pocos trabajos al respecto y la relación entre ER y AT1-R aún permanece en discusión. Se postula por un lado

que la señalización de AngII sería más significativa en tumores ER-negativos (Herr et al., 2008), en los cuales se propone un rol para el AT1-R en la respuesta no genómica a estrógenos (Lim et al., 2006). No obstante, otros autores han reportado una marcada sobreexpresión de AT1-R en tumores ER-positivos/ ERBB2-negativos (Rhodes et al., 2009). Es interesante destacar que, estudios *in vitro* en células MCF-7 resistentes al tamoxifeno, revelaron un incremento en los niveles de AT1-R comparado con la línea parental. Dichos efectos, fueron contrarrestados tras el bloqueo del receptor con losartan (Namazi et al., 2014).

4.2.3 Relevancia clínica.

Si bien aún no está claro si los efectos de ARBs e iECA, observados a nivel pre-clínico, poseen relevancia clínica en el tratamiento de tumores mamarios, existen escasos reportes que asocian el uso de dichos antagonistas con pronósticos favorables en pacientes con cáncer de mama (Chae et al., 2011; Mc Menamin et al., 2012). En un estudio retrospectivo del *MD Anderson Cancer Center (Texas, USA)*, no se reportaron diferencias en la respuesta patológica completa entre grupos de pacientes con cáncer de mama, sometidos a una quimioterapia neoadyuvante con ARBs/iECA o simplemente a la terapia convencional sin antagonistas del RAS. Sin embargo, en un análisis subgrupal, en el que se evaluó la supervivencia en un lapso de 5 años libre de reincidencia, se observó un incremento del 72 al 81% en aquellos pacientes que incorporaron algún ARB en su terapia (Chae et al., 2013).

Por otro lado, tanto los ARBs como Ang-(1-7) han demostrado efectos beneficiosos tanto en células tumorales como en el microambiente tumoral (Chen et al., 2013; Cook et al., 2010). Ambos fueron capaces de reducir la secreción y deposición de colágeno, favoreciendo el *delivery* de drogas y potenciando la quimioterapia (Chauhan et al., 2013; Diop-Frimpong et al., 2011). Es de notar además, que los efectos protectores de los ARBs en tumores podrían potenciarse por la activación del MAS-R, tal como se sugiere en estudios de remodelado vascular (Iwai et al., 2012). Por lo tanto, la incorporación de ARBs/Ang-(1-7) como terapia adyuvante a la quimioterapia convencional, podría constituir una estrategia interesante para mejorar no sólo la eficiencia de la misma, sino también reducir sus efectos colaterales. Además, es fundamental el desarrollo de nuevos agentes capaces de discriminar de manera más precisa entre vías de señalización individuales.

OBJETIVOS

Objetivo general:

De acuerdo a los antecedentes mostrados, el objetivo principal de este trabajo de tesis consiste en investigar el rol del RAS en la involución mamaria post-lactancia y determinar los efectos de AngII y de Ang-(1-7) en el desarrollo tumoral mamario.

Objetivos específicos:

- Analizar la expresión de los componentes del RAS, durante la involución mamaria.
- Estudiar el rol de AngII en la inducción de factores relevantes para desencadenar la involución, así como la apoptosis del epitelio mamario durante dicho proceso.
- Estudiar la relevancia del receptor AT1-R de AngII en el desarrollo de la involución mamaria
- Estudiar los efectos de Ang-(1-7) sobre la expresión de factores de supervivencia y MAPKs desencadenados por AngII, en células epiteliales mamarias no tumorales.
- Estudiar la regulación de Ang-(1-7) sobre la Transición Epitelio Mesenquimal (TEM) desencadenada por AngII, en células epiteliales mamarias no tumorales.
- Determinar la incidencia de Ang-(1-7) sobre la migración e invasión, inducidas por AngII en células tumorales. Asimismo, estudiar la modulación de factores que favorecen la angiogénesis y metástasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos utilizados.

A continuación, se describen los reactivos generales utilizados para la realización de esta Tesis. El ácido acético, cloroformo, formalina y alcoholes isopropílico, etílico y metílico fueron adquiridos en Cicarelli (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina). Las sales inorgánicas y los detergentes SDS, Tween 20 y Tritón X-100 provienen de la empresa Biopack (Zárate, Buenos Aires, Argentina). Los reactivos para biología molecular, tales como glicina, β -Mercaptoetanol, agarosa y TEMED fueron adquiridos en Promega (Madison, WI, USA); el paraformaldehído (PFA) y el ortovanadato de sodio (Na_2VO_4) provienen de Calbiochem (San Diego, CA, USA); la Acrilamida/Bisacrilamida y el reactivo de *Bradford* (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) son de la empresa Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

El resto de los reactivos particulares utilizados, se detallan en simultáneo junto a la técnica correspondiente.

2. Cultivo de líneas celulares.

2.1 Líneas celulares mamarias normales.

2.1.1. Línea celular HC11.

La línea celular HC11 es una línea de células epiteliales de mama no tumorigénica, originada a partir de tejido de la glándula mamaria de una hembra preñada de la cepa de ratones BALB/c (Ball et al., 1988). Estas células mantienen las características de células epiteliales mamarias normales, siendo la más importante su capacidad de sintetizar proteínas de la leche luego del tratamiento con hormonas lactogénicas (Ball et al., 1988; Danielson et al., 1984). Cedido gentilmente por la Dra. Nancy Hynes, las células HC11 se cultivaron en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% penicilina/estreptomicina y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina.

2.1.2. Línea celular NMuMG/E9.

La línea celular murina NMuMG es una línea de células epiteliales de mama. Particularmente las células NMuMG/E9, derivan de un subclon obtenido por dilución limitante de la línea parental (Maeda et al., 2005). Éstas presentan una morfología epitelial, son muy compactas y presentan uniones célula-célula bien organizadas. A su vez, expresan tanto E-cadh como N-cadh, siendo la expresión de E-cadh mayor en condiciones normales. En este caso, la línea celular fue cedida gentilmente por el Dr. Gerhard Christofori del Departamento de Biomedicina de la

Universidad de Basel, Suiza. Las células NMuMG/E9 se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) alta glucosa, suplementado con 10% de SFB y 1% penicilina/estreptomicina.

2.2. Líneas celulares mamarias tumorales.

2.2.1. Línea celular LM3.

La línea celular LM3, gentilmente cedida por la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, deriva de un adenocarcinoma mamario (M3), generado de manera espontánea en ratones de la cepa BALB/c (Urtreger et al., 1997) en el laboratorio de la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, del Área de Investigación del Instituto Ángel Roffo, Buenos Aires, Argentina. Las células se cultivaron en medio MEM (*Minimum Essential Medium*), suplementado con 5% de SFB y 1% penicilina/estreptomicina.

2.2.2. Línea celular MDA MB-231.

La línea celular de cáncer de mama humano MDA MB-231 (ER-, PR-, HER2-), cedidas por la Dra. Adalí Pecci, fueron cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de SFB y 1% penicilina/estreptomicina.

Cabe aclarar que los medios de cultivo, SFB, penicilina/estreptomicina y tripsina utilizados en este trabajo fueron adquiridos de la empresa Gibco (Waltham, MA, USA). Asimismo, todas las líneas celulares fueron cultivadas en placas de plástico de 100 mm (Corning, NY, USA) en una estufa a 37 °C y 5 % de CO₂.

2.3. Tratamientos.

Los estudios de los efectos de AngII y/o Ang-(1-7) sobre la activación de AKT y ERK1/2, en células mamarias normales, se realizaron en placas de 6 pocillos (Corning, NY, USA). Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia, se las hambreadó en medio libre de suero durante 3 hs. Posteriormente, las células fueron estimuladas a distintos tiempos con AngII y/o Ang-(1-7) (Bachem, Bubendorf, Suiza) a una concentración final de 10⁻⁷ M (Zhang et al., 2010). Para la línea celular NMuMG, los tiempos de estímulo con AngII, Ang-(1-7) o ambas fueron 1, 5, 15, 30 o 60 min. El protocolo de estímulo conjunto con ambas angiotensinas, consistió en incubar las células, en primer lugar, con Ang-(1-7) durante 1 minuto en estufa a 37°C, para luego estimularlas con AngII. Una vez detectado el pico de activación con ambos péptidos, las células NMuMG fueron previamente tratadas

durante 5 minutos con antagonistas farmacológicos específicos de los receptores de AngII y Ang-(1-7). Como antagonistas de los receptores de AngII, se utilizaron irbesartan (AT1-R) y PD123319 (AT2-R). Para Ang-(1-7), los inhibidores utilizados fueron A779 y D-Pro⁷-Ang-(1-7) (MAS-R). Todos ellos fueron utilizados a una concentración final de 10⁻⁶ M (Zhang et al., 2010), y fueron cedidos gentilmente por el Dr. Thomas Walther de la *Universität Leipzig* (colaborador de nuestro grupo en Leipzig, Alemania).

Para los ensayos de migración, se estimularon células MDA-MB-231 con AngII, Ang-(1-7) o ambas a una concentración final de 10⁻⁷M, en el caso de la migración por cicatrización de herida; en el caso de la migración/invasión a través de cámaras *transwell* la concentración final utilizada fue 10⁻⁶M. Para los ensayos de viabilidad (MTS), zimografía, y expresión de los genes de progresión tumoral VEGF y MMP-9, llevados a cabo en esta línea celular, la concentración de AngII y/o Ang-(1-7) empleada fue de 10⁻⁷M. En todos los casos, el estímulo conjunto con ambas angiotensinas se realizó tal como se detalló en el párrafo anterior.

En el caso de los ensayos de transición epitelio mesenquimal (TEM) realizados en la línea celular NMuMG, las células fueron estimuladas con AngII, Ang-(1-7) o ambas a una concentración final de 10⁻⁷M, cada 24hs durante 3 días. Se siguió el mismo protocolo de estímulo conjunto con ambas angiotensinas que para los demás ensayos. Las células estimuladas con TGF-β 4 ng/ml final, recibieron el estímulo cada 48hs. En los ensayos en los que se utilizó el inhibidor de AKT, A6730 (*Akt1/2 kinase inhibitor*; Sigma, St. Louis, MO, USA), la concentración final del mismo fue de 1μM. Éste se agregó al medio de cultivo 1 hora antes de la estimulación con las angiotensinas, cada 48 h.

3. Trabajo con animales.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (*NIH Publication*, 1986), y los lineamientos de la ley federal para el uso de animales de experimentación de Argentina y el Reino Unido. Asimismo, todos los protocolos fueron aprobados por las autoridades locales.

Los ratones se mantuvieron en jaulas en cuartos acondicionados a 20 ± 2°C bajo un esquema automático controlado de 12 h luz/12 h oscuridad, con comida y agua *ad libitum*.

3.1. Ratones Balb/c.

Los ratones de la cepa salvaje (*wt*) Balb/c fueron criados en el Bioterio de la Academia Nacional de Medicina. Los apareos se realizaron con hembras vírgenes y machos entre 12 y 16 semanas de vida, y el comienzo de la preñez se determinó por observación del tapón vaginal. Luego del nacimiento de las crías, las hembras fueron colocadas en jaulas separadas, normalizándose el número de crías a 4-6 por ratón. Éstas fueron removidas entre los días 7-10 de lactancia.

3.2. Ratones C57BL/6.

Ratones deficientes (*KO*) en AT1a-R ($AT1a^{-/-/+}$, $AT1aKO$) o en AT1b-R ($AT1b^{+/-/-}$, $AT1bKO$), fueron generados por recombinación homóloga en células madre embrionarias. Éstos fueron utilizados a continuación, para generar ratones deficientes en ambas isoformas del receptor (*double knock out*, *DKO*): AT1a/AT1b *DKO* ($AT1a/AT1b^{-/-/-}$) (Oliverio et al., 1998). La adquisición de estos ratones y todas las cruces fueron realizadas por el grupo de trabajo del Dr. Thomas Walther (Universität Leipzig, Leipzig, Alemania), quienes nos cedieron directamente muestras de tejido de ratones *KO* y *DKO* fijadas en cortes de parafina, para llevar a cabo una serie de ensayos, que se detallarán más adelante.

3.3. Tratamientos.

Los estudios de la expresión de los componentes del RAS durante la involución mamaria, se realizaron utilizando mamas provenientes de hembras con lactancia establecida entre 8 y 10 días, y hembras en involución, inducida por el retiro forzado de las crías luego de 6, 24, 48, 72 y 96 hs.

Para los estudios *in vivo* de la capacidad de AngII de inducir la fosforilación de STAT3 y ERK1/2, se utilizaron mamas provenientes de hembras con 7 - 10 días de lactancia establecida, a las cuales se les administraron de forma intramamaria: 50 μ l de AngII (10^{-6} M) en NaCl 0.9% (vehículo), NaCl 0.9% (control), irbesartan (10^{-5} M), o irbesartan (10^{-5} M) + AngII (10^{-6} M) en un volumen final de 50 μ l en el mismo vehículo. En todos los casos, ambas mamas del par N° 4 (abdominal) recibieron el mismo volumen de AngII o solvente, descartando así efectos de activación inespecífica generados por el estiramiento a causa del volumen inoculado. Además, se realizaron controles con inyección de azul de metileno, para corroborar que la solución inyectada quedara efectivamente dentro de la glándula.

En el caso del tratamiento sistémico, se inyectaron de forma subcutánea en el lomo del animal 150 μ l de AngII (10^{-5} M) disuelta en NaCl 0.9% o el mismo volumen de vehículo (control). Los animales se sacrificaron a los 30 min o 60 min post tratamiento, y se extrajeron las respectivas glándulas. Los ratones tratados de manera sistémica con losartan (inhibidor específico del receptor AT1) (DuPont, Boston, MA, USA), recibieron una dosis diaria de 20 mg/kg en NaCl 0.9% (Diop-Frimpong et al., 2011) o NaCl 0.9% únicamente (control). La inyección fue subcutánea en el lomo del animal, tal como lo describieron previamente otros autores (Wang et al., 2003), y la primera dosis se administró un día previo al destete forzado. Durante la involución, los animales recibieron una dosis diaria. Éstos fueron sacrificados a las 24, 48, 72, 96 y 120 hs post-destete, removiéndose las mamas para su posterior análisis. Con respecto al protocolo de tratamiento con PD123319 (inhibidor específico del receptor AT2) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), los ratones fueron inyectados de manera sistémica, recibiendo una dosis diaria de 0.625 mg/kg en NaCl 0.9% o NaCl 0.9% únicamente (control). Al igual que con losartan, la primera dosis se administró un día previo al destete forzado, recibiendo luego una dosis diaria durante el tiempo de involución correspondiente. En este caso, el ensayo se llevó a cabo en hembras en involución 24, 48 y 72 hs, las cuales fueron sacrificadas y sus mamas removidas para su posterior análisis.

3.4. Extracción de tejido mamario.

Luego de sacrificar a las hembras por dislocación cervical, se obtuvo el tejido mamario en todos los casos por remoción del par de mamas N^o4 (abdominales), las cuales fueron extraídas en su totalidad (**Figura MyM-1**). Para la purificación de ARN y proteínas, las glándulas se cortaron en fragmentos de no más de 0.5 cm de diámetro, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, para su posterior almacenamiento a -80°C . En el caso de las mamas utilizadas para análisis histológico, se cortaron en fragmentos de 1 cm de diámetro, y se procedió a la rápida fijación en formalina al 10%, tamponada con buffer fosfato a pH 7.0.

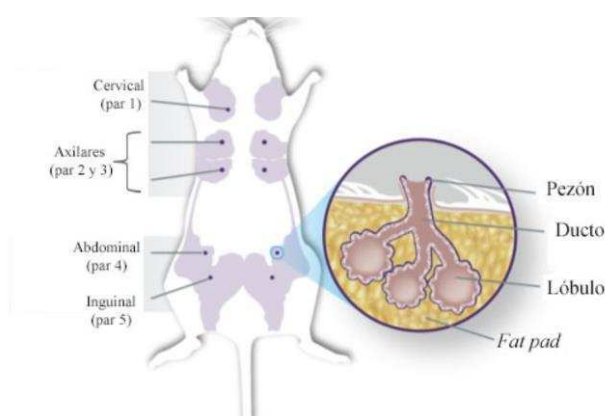


Figura MyM-1. Disposición de los 5 pares de glándula mamaria en ratón. Se destacan las estructuras internas en una de las mamas del par N^o4, utilizado para los experimentos realizados.

4. Ensayos bioquímicos y moleculares.

4.1. Análisis de proteínas.

4.1.1. Purificación de proteínas.

Para extraer proteínas tanto de células como de tejido, se utilizó *buffer* de lisis RIPA (Tris HCl 20 mM, pH 7.4; EDTA 2 mM; NaCl 150mM; Glicerol 10%; SDS 0,1%; Deoxicolato de Sodio 0,5%; Tritón X100 1%) suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail set I*, Calbiochem, San Diego, CA, USA; PMSF 1mM) y fosfatasas (1mM NaF, 40 mM β -glicerofosfato de sodio y 1 mM de Na₂VO₄).

En el caso de la extracción de proteínas de líneas celulares, se partió de placas de 6 pocillos con células al 80% de confluencia. Luego del tiempo de la incubación con su estímulo correspondiente, se aspiró el medio con pipeta, se lavaron los pocillos con PBS y se colocaron las placas rápidamente en hielo. Se agregaron 100 μ l del *buffer* de extracción y, con la ayuda de un rastrillo de goma, se levantó el lisado celular y se lo trasvasó a microtubos mantenidos en hielo.

Para la extracción de proteínas a partir de tejido, se utilizaron 50-100 mg de tejido mamario congelado a -80°C, al cual se le agregaron 600 – 800 μ l del *buffer* de extracción. Se disgregaron las muestras con un homogenizador de tejido (*Tissue Tearor*, modelo 985370) y se las mantuvo en hielo. A continuación, se las sonicó durante 3 ciclos de 10 segundos a una potencia del 20% (*Sonic Dismembrator Model 500*, Fisher Scientific)

Para ambos tipos de muestras, se realizaron tres ciclos de congelamiento a -80°C y descongelamiento en hielo, luego de lo cual se mantuvieron los tubos en hielo por al menos 30 minutos. Posteriormente, se los centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos microtubos y conservados a -80°C para su posterior uso. En el caso de la extracción a partir de tejido, el paso de centrifugación se repitió al menos dos veces. La concentración de proteínas presente en el sobrenadante se determinó mediante el método *Bradford* (Bradford, 1976). Se utilizaron placas de 96 pocillos (Corning, NY, USA) con 200 μ l del reactivo de *Bradford* y 10 μ l de la muestra de proteínas a analizar, llevadas a volumen con H₂O bidestilada. La curva de calibración se realizó con concentraciones creciente (1 - 10 μ g/ μ l) de albúmina sérica bovina (BSA) (Promega, Madison, WI, USA). La medición se realizó a 595nm en un lector de ELISA (*Glomax Multi Detection System*, Promega, Madison, WI, USA).

4.1.2. Ensayo de Western blot.

25 µg de proteínas fueron llevadas a un mismo volumen con H₂O bidestilada. Se agregó *buffer* de siembra 5X (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8; SDS 2%; Glicerol 10%; Azul de Bromofenol 0,006%; β-Mercaptoetanol 5%) y se las calentó 5 minutos a 100°C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente, las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida/SDS de porcentaje variable (8-12%), dependiendo del grado de resolución entre proteínas deseado. Se sembró además un marcador de peso molecular conocido (*Page Ruler Plus prestained marker*, Pierce, CA, USA; *Rainbow marker*, GE Healthcare, UK). La composición de los geles separadores utilizada fue: Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) entre 8 y 12%; 0,375 M Tris-HCl pH=8,8; 0,1% de SDS; 0,03% de persulfato de amonio; 0,07% de TEMED. La composición de los geles concentradores utilizada fue: Acrilamida:Bisacrilamida (29:1); 0,125 M de Tris-HCl pH 6.8; 0,1% de SDS; 0,05% de persulfato de amonio; 0,1% de TEMED. Las muestras se corrieron a voltaje constante (30 minutos a 80 V y 2 horas a 120 V) en el *buffer* correspondiente (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; Glicina 192 mM; SDS 0.1%), y luego se electro-transferieron en frío a una membrana de PVDF (Amersham, GE Healthcare) a 300 mA durante 1,5 horas en *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; Glicina 192 mM; Metanol 20%).

Finalizada la electrotransferencia, se realizó una tinción de las proteínas en la membrana durante 5 minutos con una solución de rojo Ponceau-S (Rojo Ponceau 0,1%; Ácido Acético 5%) para verificar la eficiencia de la transferencia. Luego, se lavó y se bloqueó la membrana a temperatura ambiente durante 1 hora con una solución al 5% de leche descremada (Purísima) en TBS-T 1X (NaCl 140 mM; Tris-base 24 mM; 2 mM KCl pH 8.0; 0,1% de Tween) en agitación constante. Posteriormente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla MyM-1**) en TBS-T conteniendo 3% de leche descremada, o 3% de BSA en el caso de anticuerpos fosforilados. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en TBS-T, y luego se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con el respectivo anticuerpo secundario (**Tabla MyM-2**), preparado en 3% leche en TBS-T. A continuación, se repitió el protocolo de lavado. Finalmente, el *western blot* fue revelado por quimioluminiscencia, utilizando el sistema *ECL-Prime* (Amersham, GE Healthcare) según indicación del fabricante.

La señal de quimioluminiscencia fue capturada utilizando el analizador de imágenes SyngeneG:Box XR5. El peso molecular de las bandas detectadas se comparó con un marcador de peso molecular sembrado en el mismo gel. La

intensidad de las bandas presentes en las imágenes fueron cuantificadas por densitometría utilizando el programa ImageJ 1.37v software (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los valores de intensidad obtenidos para cada banda fueron normalizados, con respecto a la cuantificación de las señales de GAPDH o β -Actina, al control correspondiente. Para los casos en donde se analizaron los niveles de fosforilación de proteínas, la cuantificación obtenida para los niveles de la proteína fosforilada fueron normalizados contra los valores obtenidos para la proteína total y nuevamente fue referido al respectivo control.

Tabla MyM-1. Listado de anticuerpos primarios utilizados en la técnica de Western blot.

Anticuerpo	Especie	Proveedor	Nº de Catálogo	Dilución
anti-AT1 (N-10) §	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-1173	1:800
anti-AT2 (H-143) §	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-9040	1:800
anti-pERK1/2 (E-4)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-7383	1:1000
anti-ERK2	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-154	1:1000
anti-pAKT (Ser473)	Conejo	Cell Signaling	4060	1:1000
anti-AKT	Ratón	Cell Signaling	2920	1:1000
anti-pSTAT3 (Tyr705)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-8059	1:800
anti-STAT3 (C-20) *	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-482	1:800
Anti-BCL-X _{S/L} (L-19)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	Sc-1041	1:1000
anti- β -actina (I-19)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616-R	1:3000
anti-GAPDH	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-365062	1:1000

* También utilizado para estudios de inmunohistoquímica en una dilución 1/100.

Tabla MyM-2. Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de Western blot.

Anticuerpo	Especie	Proveedor	Catálogo	Dilución
anti-ratón	Cabra	Bethyl Laboratories	A90-516P	1:5000
anti-conejo	Cabra	Bethyl Laboratories	A120-201P	1:5000

4.1.3. Inmunoprecipitación.

500 ug de proteína de tejido mamario y 3 ul de anticuerpo primario anti STAT3 (1 ug) (**Tabla MyM-1**), fueron llevados a un volumen final de 300ul con *buffer* RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora a 4°C. A continuación, se añadieron 20 ul de Proteína A/G PLUS–Agarosa (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), y se incubaron los tubos a 4°C durante toda la noche, en una plataforma oscilante. Cumplido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados del *pellet* en *buffer* RIPA (centrifugaciones de 1 minuto a 12000 rpm a 4°C). Finalmente, se resuspendieron las muestras en 15 µl de H₂O bidestilada, se agregó *buffer* de siembra y se prosiguió de igual manera que en el inciso anterior.

4.1.4. Zimografía.

4.1.4.1. Tejido mamario.

Se homogenizaron 50-100 mg de tejido mamario congelado a -80°C en *buffer* RIPA, tal como se describió anteriormente (*Purificación de proteínas*). Los homogenatos se centrifugaron durante 15 min a 4°C y se colectaron los sobrenadantes. Luego, se realizó una cuantificación del contenido proteico mediante el ensayo de Bradford, y se tomaron 20 µg de cada extracto. Éstos se resuspendieron en el volumen correspondiente de *buffer* de siembra 5X sin β-Mercaptoetanol, y se los incubó durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS 8,8% co-polimerizados con 1mg/ml de gelatina. La corrida se llevó a cabo en las mismas condiciones previamente detalladas (*Ensayo de Western Blot*). Finalizada la corrida, los geles se lavaron durante 30 min en agitación en una solución 2.5% de Tritón X-100, para eliminar los restos de SDS en y renaturalizar las MMPs en el gel. Posteriormente, se incubaron los geles durante 24 h a 37°C en *buffer* de revelado (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4; 200 mM NaCl; 5 mM CaCl₂, 2 H₂O; 0,02% Tritón X-100), para inducir la lisis de la gelatina por las proteasas renaturalizadas. Luego, los geles se tiñeron en una solución de *Coomasie blue R-250* (*Coomasie blue R-250* 0,1%; Ácido Acético 10%; Metanol 30%): se los colocó en el microondas hasta observar la aparición de burbujas, durante tres ciclos. Se destiñeron los geles con una solución Ácido Acético 10%, Metanol 30%, hasta visualizar zonas claras en el gel teñido de azul, indicativo de la actividad proteolítica de las proteasas. Finalmente, los zimogramas se conservaron en agua corriente. Éstos fueron escaneados y analizados por densitometría, utilizando la

versión para PC del *NIH Image* (Scion Corp., Frederick, MD, USA). Este ensayo fue realizado en colaboración con la Dra. Marina Simian del Instituto Ángel Roffo.

4.1.4.2. Medios condicionados.

Para analizar la actividad de MMP-9 en la línea celular MDA-MB-231, se crecieron las células en placas de 60 mm (Corning, NY, USA) con medio completo. Una vez alcanzado el 80% de confluencia, se lavaron las células con PBS y se las incubó con 1.5 ml de medio sin SFB por placa durante 8 hs. Se estimularon las células con AngII, Ang-(1-7) o ambas a una concentración de 10^{-7} M, y se las incubó a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se colectaron los medios en microtubos y se los centrifugó durante 5 min a 800 rpm, para remover restos celulares. Se tomaron 20µl de los sobrenadantes, y se resuspendieron en 5 µl de *buffer* de siembra 5X sin β-Mercaptoetanol, para ser sembradas. Por otro lado, se lisaron las células con *buffer* RIPA, seguido de una cuantificación del contenido proteico mediante ensayo de *Bradford*.

A continuación, la zimografía se realizó siguiendo el mismo protocolo que para extractos de tejido mamario. Finalmente, los zimogramas fueron escaneados y analizados por densitometría, y la actividad de las MMPs de interés, se calculó relativizando el área medida a la cantidad de proteínas totales. Los resultados se expresaron como las veces de cambio respecto al control sin tratar.

4.2. Análisis de ácidos nucleicos.

4.2.1. Purificación de ARNm.

Para la extracción de ARN total, a partir de líneas celulares, se partió de placas de 6 pocillos. Con excepción de los ensayos de TEM, la confluencia de las células al momento de la extracción, fue del 80%. Luego de aspirar el medio de cultivo, se lavaron los pocillos con PBS y se colocaron las placas rápidamente en hielo. Posteriormente, se agregaron 500 ul del reactivo *Tri-Reagent* (MRC, Cincinnati, OH, USA) por pocillo y se levantó el lisado celular para finalmente trasvasarlo a microtubos. A continuación, se siguió el protocolo de obtención de ARN proporcionado por el fabricante, el cual incluye: 1) una extracción con cloroformo; 2) la precipitación del ARN con isopropanol; 3) el lavado del pellet de ARN con etanol 75%; 4) secado del pellet; 5) re-suspensión del pellet en agua libre de ribonucleasas.

Para la extracción de ARN total, a partir de tejido mamario normal, se utilizó el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega). Los reactivos provistos por el *kit* se marcan entre comillas.

En primer lugar, se disgregaron los fragmentos de tejido congelados con un homogenizador (*Tissue Tearor*, modelo 985370) con 600-800 μl de "*Lysis Buffer*" y se las mantuvo en hielo. Se mezclaron 175 μl de los homogenatos con 350 μl de "*RNA Dilution Buffer*" y se los incubó durante 3 minutos a 70 °C. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se trasvasaron los sobrenadantes a microtubos nuevos. Se agregaron 200 μl de etanol 95% y se transfirió todo el volumen a las columnas provistas por el *kit*. Se realizó una centrifugación a 12000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente, y se descartó el líquido eluído. Se lavó cada columna con 600 μl de "*RNA Wash Solution*" y se centrifugó nuevamente. Se volvió a descartar el líquido eluído y se realizó una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente con una mezcla compuesta de 40 μl de "*Yellow Core Buffer*", 5 μl de "*MnCl₂*" y 5 μl de "*DNAsa Solution*". Se frenó la reacción por el agregado de 200 μl de "*DNAsa Stop Solution*" y posterior centrifugación. Se realizaron dos lavados sucesivos con "*RNA Wash Solution*", luego de lo cual se dejaron secar las columnas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, éstas se colocaron sobre microtubos nuevos, se agregaron 100 μl de "*Nuclease Free Water*" y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Los tubos fueron rápidamente colocados en hielo y guardados a -80 °C.

En todos los casos, los ARN obtenidos fueron cuantificados en el espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), a partir de la medición de la absorbancia a 260 nanómetros. Como parámetro de pureza, se usaron únicamente aquellas muestras con una relación 260/280 nm > 1,8. Para comprobar la integridad del ARN, se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1%, en buffer TAE (Tris 40 mM; EDTA 1mM; ácido acético glacial 20 mM) teñidos con bromuro de etidio (BrEt) (Promega), y se evaluó la presencia de las dos bandas correspondientes al ARN ribosomal. Finalmente, las muestras fueron conservadas a -80°C.

4.2.2. Transcripción reversa (RT).

Se utilizaron 3 μg de ARN total para muestras provenientes de tejido mamario o 1 μg de ARN total si éste provenía de monocapas celulares. Al volumen de ARN total correspondiente, se le agregaron 0.25 μl de Oligo-dT (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina), llevándolo a un volumen final de 7 μl con H₂O libre de ribonucleasas. Luego, se procedió con una desnaturalización de los ARN por

calentamiento a 70 °C durante 5 minutos en un termociclador *Multigene Gradient Thermal Cycler* (Labnet, Edison, NJ, USA), seguido de un enfriamiento rápido en hielo para evitar la re-naturalización. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 13 ul de una mezcla que contenía los siguientes reactivos: 1mM de dNTPs (Promega), 20U de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin, Promega) y 200U de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega), en su *buffer* de transcripción MMLV 1X, y se llevó a cabo la reacción de retro- transcripción durante 60 minutos a 42°C, seguidos de 5 minutos a 95 °C con el fin de inactivar a la enzima MMLV. Los ADN copia (ADNc) obtenidos, fueron utilizados el mismo día de su síntesis para realizar la PCR correspondiente. Luego, fueron conservados a -20°C.

4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

4.2.3.1. PCR estándar.

Para detectar la expresión de algunos de los genes en estudio, se realizaron *PCRs* estándar a punto final. Se utilizaron 2 ul del ADNc obtenido, en una mix de reacción conteniendo: 1 a 4mM de MgCl₂, 0.25mM de dNTPs, 2 ng/ml de cada oligonucleótido específico para la secuencia a amplificar (**Tabla MyM-3**), y 1.25 U Taq polimerasa en su correspondiente *buffer* de polimerización 1X, todo llevado a un volumen final de 25 ul con agua destilada libre de ribonucleasas. Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en Invitrogen (Waltham, MA, USA), excepto los dNTPs que son de Promega.

Los oligonucleótidos fueron diseñados mediante el programa *Primer3*, de manera de obtener secuencias óptimas. Se tuvo en cuenta la elección de oligonucleótidos que permitan amplificar secuencias ubicadas en exones diferentes.

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 4 minutos a 94°C; n° de ciclos variable (de acuerdo al *primer* utilizado; **Tabla MyM-3**) de: 20 segundos cada uno a 94°C, 20 segundos a la correspondiente temperatura de hibridación de los *primers* y 25 segundos a 72°C; 5 min a 72°C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Multigene Gradient Thermal Cycler* (Labnet, Edison, NJ, USA).

Para cada uno de los pares de oligonucleótidos utilizados, se realizó un gradiente de temperatura, así como curvas de concentración de MgCl₂, para seleccionar las condiciones óptimas de cada reacción. Asimismo, el número de ciclos de amplificación utilizado en cada caso, se eligió de manera tal que el producto quedara comprendido dentro de la fase lineal de la curva semi-logarítmica: n° ciclos vs producto amplificado, para poder comparar así la cantidad

de templado inicial en cada muestra. En cada una de las reacciones, se amplificaron los ADNc de β -actina o GAPDH como control de carga.

Los productos obtenidos se detectaron por electroforesis en geles de agarosa 2% en buffer TAE y teñidos con BrEt. La señal de UV fue visualizada y capturada utilizando el analizador de imágenes Singani G:Box XR5.

Tabla MyM-3. Listado de primers utilizados para PCR estándar.

Gen	Especie	Secuencia	Temp Annealing	Tamaño	Nº ciclos	Referencia
mAT1	ratón	Sentido: 5'-GGAAACAGCTTGGTGGTGATC-3' Antisentido: 5'-CTGAGACACGTGAGCAGGAAC-3'	64°C	236	35	diseñados
hAT1	humano	Sentido: 5'-AGCTATGGAATACCGCTGGC-3' Antisentido: 5'-TGATGCAGGTGACTTTGGCT-3'	60°C	188		diseñados
mAT2	ratón	Sentido: 5'-TTGGATGCTCTGACCTGGATG-3' Antisentido: 5'-TAATGGGAACTCTAAACACACTGC-3'	64°C	181	37	diseñados
β -Actina	ratón	Sentido: 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3' Antisentido: 5'-CGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'	61°C	245		diseñados
mGAPDH	ratón	Sentido: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTC-3' Antisentido: 5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG-3'	62°C	111	30	diseñados
hGAPDH	humano	Sentido: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTC-3' Antisentido: 5'-TTGATTTTGAGGGATCTCG-3'	62°C	238	30	Bertucci et al., 2013
mMAS1	ratón	Sentido: 5'-ACCTCCAGCAGAAATGCCTC-3' Antisentido: 5'-TCTCCTCATCCGGAAGCAGA-3'	58°C	138	35	diseñados
hMAS1	humano	Sentido: 5'-AGGAACCCACGAACATCTCA -3' Antisentido: 5'-TCTTCTCATCCGGAAGCACA -3'	62°C	155		cedidos por el Dr. Walther

4.2.3.2. PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Todas las RT-qPCR en este trabajo se realizaron en un volumen final de 25 μ l con 1 a 4 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, 2 ng/ml de cada oligonucleótido específico

para la secuencia a amplificar, 1.25 U Taq polimerasa en su correspondiente *buffer* de polimerización 1X, y *SYBR Green* en una dilución 1:30.000 en DMSO (Roche, Basilea, Suiza). En la **Tabla MyM-4** se describen todas las secuencias de los *primers* empleados para las *RT-qPCRs*.

Al igual que para *PCR* estándar, los oligonucleótidos fueron diseñados mediante el programa *Primer3*, de manera de obtener secuencias óptimas. Nuevamente, se tuvo en cuenta la elección de oligos que permitan amplificar secuencias ubicadas en exones diferentes.

Las *RT-qPCRs* se llevaron a cabo en el ciclador *Stratagene Mx3000P QPCR System* (Agilent Technologies), empleando 5 μ l de una dilución 1/5 a 1/20 de cada ADNc obtenido, dependiendo de los *primers* utilizados en cada caso.

Para los ensayos de expresión de los componentes del RAS (AT1-R, AT2-R, AGT y ECA) en muestras de tejido, se utilizó el siguiente programa: 5 minutos a 94°C, 40 ciclos de 20 segundos cada uno a 94°C, 20 segundos a la correspondiente temperatura de hibridación de los *primers*, y 30 segundos a 72 °C. Para los ensayos de TEM y de expresión de VEGF y MMP-9 en líneas celulares, el programa fue el siguiente: 3 minutos a 94°C, 40 ciclos de 15 segundos cada uno a 94°C, 20 segundos a la correspondiente temperatura de hibridación de los *primers*, y 25 segundos a 72°C. En ambos programas, se efectuó una lectura de la fluorescencia producida al finalizar cada paso a 72°C.

Para establecer las condiciones óptimas para cada par de *primers*, se realizaron gradientes de temperatura de hibridación (60 a 68 °C) y de concentración de MgCl₂ (1 a 4 mM), seleccionando aquellas condiciones que permitían obtener un sólo producto de amplificación mediante la observación de las curvas de *melting* y posterior separación en geles de agarosa, teñidos con BrEt. Luego, la eficiencia de los mismos se determinó mediante curvas de diluciones seriadas, realizadas con controles positivos, donde la pendiente de la recta obtenida debió encontrarse entre -3.2 y -3.5, para garantizar dicha eficiencia.

Para poder estimar la cantidad de molde inicial relativa en cada muestra, se utilizaron los siguientes métodos de cuantificación:

- a) Curva de estándares: se realizó en cada reacción una curva de calibración con diluciones seriadas al medio, partiendo de una mezcla de los ADN canalizados. Luego, utilizando el programa *MxPro QPCR Software* (Agilent Technologies) se calculó la cantidad de masa inicial relativa en cada muestra, se promediaron las réplicas y se normalizaron a los valores obtenidos para los genes *β -Actina* o *Gapdh*.

b) $\Delta\Delta Ct$: con los datos de Ct obtenidos, se realizaron los cálculos utilizando el programa *Microsoft Excel* aplicando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct$ (Gen de interés) - Ct promedio (Gen de Referencia), donde el gen de referencia fue *Gapdh*. Cada punto de análisis fue ensayado por triplicado y posteriormente promediado.

Tabla MyM-4. Listado de primers utilizados para RT-qPCR.

Gen	Especie	Secuencia	Temp Annealing	Tamaño	Referencia
<i>Acta2</i>	ratón	Sentido: 5'-ACCACCATGTACCCAGGCATT-3' Antisentido: 5'-GCTGGAAGGTAGACAGCGAAG-3'	62°C	154	diseñados
<i>AGT</i>	ratón	Sentido: 5'-GCCATCCGCCTGACTCTG-3' Antisentido: 5'-TGTTCTCCTCTCCTGCTTTG -3'	64°C	191	diseñados
<i>AT1</i>	ratón	Sentido: 5'-CCAGCGTCAGTTTCAACCTCTAC-3' Antisentido: 5'-GCCAAGCCAGCCATCAGC -3'	64°C	160	diseñados
<i>AT2</i>	ratón	Sentido: 5'-GATGGAGGGAGCTCGGAACT-3' Antisentido: 5'-TTGAACTGCAGCAACTCCAAATT -3'	63°C	143	diseñados
<i>β-Actina</i>	ratón	Sentido: 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3' Antisentido: 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'	61°C	245	diseñados
<i>ECA</i>	ratón	Sentido: 5'-CGCTGGAGGGTCTTTGATGGAAG-3' Antisentido: 5'-TCGTGGAAGTGGAACTGGATGATG -3'	68°C	203	diseñados
<i>E-cadherina (Cdh1)</i>	ratón	Sentido: 5'-GCTTCAGTTCCGAGGTCTACAC-3' Antisentido: 5'-CTGTGATGGTGCCGTCTGTC -3'	68°C	162	cedidos por la Dra Srebrow
<i>Fibronectina (Fn1)</i>	ratón	Sentido: 5'-TACCAAGGTCAATCCACACCCC-3' Antisentido: 5'-CAGATGGCAAAGAAAGCAGAGG -3'	68°C	366	cedidos por la Dra Srebrow

<i>mGapdh</i>	ratón	Sentido: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTC-3' Antisentido: 5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG-3'	62°C	111	diseñados
<i>hGapdh</i>	humano	Sentido: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTC-3' Antisentido: 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'	62°C	238	Bertucci et al., 2013
<i>LIF</i>	ratón	Sentido: 5'-GGCAACCTCATGAACCAGATCA-3' Antisentido: 5'-GCAAAGCACATTGCTGAGGAGG-3'	60°C	336	Schere-Levy et al. 2003
<i>MMP-9</i>	humano	Sentido: 5'-AGACCTGGGCAGATTCCAAACC-3' Antisentido: 5'-GCAAAGGCGTCGTCATCACC-3'	68°C	120	Gueron et al., 2009
<i>N-cadherina (Cdh2)</i>	ratón	Sentido: 5'-TGGATGAAACGGCGGGATAA-3' Antisentido: 5'-TGTGGCTCAGCATGGATAGG-3'	62°C	224	diseñados
<i>TNF-α</i>	ratón	Sentido: 5'-GGCAACCTCATGAACCAGATCA-3' Antisentido: 5'-GCAAAGCACATTGCTGAGGAGG-3'	64°C	184	Schere-Levy et al. 2003
<i>VEGF</i>	humano	Sentido: 5'-GCCCACTGAGGAGTCCAACA-3' Antisentido: 5'-GCTGGCCTTGGTGAGGTTT-3'	62°C	62	cedidos por el Dr. Coso

4.2.4. Ensayo de protección a RNasa (RPA).

La expresión del receptor AT1-R se analizó mediante el kit RPA II (Ambion Europe Ltd, Huntingdon, UK), de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. Se hibridaron 30 ug de RNA total, extraído de tejido mamario, con una de las siguientes sondas: (1) MMAT1A: se utilizó un vector previamente descrito (Gross et al., 2000) para transcribir una sonda radioactiva complementaria a una fragmento de 352 pb, específico para el ARNm de AT1A-R; (2) rL32: se utilizó una sonda comercial (BD PharMingen, San Diego, CA, USA), complementaria a un fragmento de 127 pb del ARNm de rL32, como control de carga (Gembardt et al., 2005). Para la hibridación de las muestras de ARN, se emplearon 40,000 cpm de cada una de las sondas mencionadas. Luego, los fragmentos hibridados y protegidos de la digestión con RNasa A + T1, se separaron por electroforesis en un gel desnaturizante (5% poliacrilamida, 8 M urea). Finalmente, el análisis de los

mimos se llevó a cabo a través del sistema *Fujix BAS 2000 PhosphoImager* (Raytest, Straubenhardt, Germany). Los valores de intensidad obtenidos para AT1a-R fueron normalizados con respecto a la cuantificación de las señales de rL32.

5. Ensayos celulares.

5.1. Migración.

5.1.1. Ensayo de migración por “cicatrización de herida” (*Wound Healing Assay*).

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos en medio completo, hasta alcanzar una monocapa confluyente. Luego, se las lavó con PBS y se las hambreadó en medio sin SFB durante 8 hs. Posteriormente, se retiró el medio de cada uno de los pocillos y se realizaron 2 heridas verticales, utilizando *tips* estériles para pipeta p10 (**Figura MyM-2**). A continuación, se realizaron dos lavados con medio sin suero para quitar los restos celulares (desprendidos de la zona de la herida), y se incubaron nuevamente las células en medio libre de suero. A este tiempo se lo denominó “*tiempo 0*”. Luego, se estimularon las células con AngII, Ang-(1-7) o ambas (*Cultivo de líneas celulares: Tratamientos*), utilizándose como control negativo células sin tratar. Finalmente, se las incubó a 37°C durante 16 hs.

Para el análisis, se utilizó el método de cuantificación del área de la herida: se tomaron 3 imágenes en un total de 2 heridas por pocillo (6 en total), tomando como referencia las dos líneas horizontales que lo atraviesan (**Figura MyM-2**). Las imágenes fueron capturadas tanto a tiempo 0 como a las 16 hs post-estímulo, empleando una cámara fotográfica *Nikon Coolpix P5100* asociada a un microscopio óptico invertido de campo claro *Nikon Eclipse TS100* (Minato, Tokio, Japón). El análisis de las mismas se realizó utilizando el programa *Image-Pro Plus* (*Media Cybernetics, Inc. Rockville, MD, USA*). Brevemente, se midió el ancho del área libre de células, el cual se calcula dividiendo el área por el eje mayor. Luego, se definió “la capacidad migratoria” como la diferencia entre el área no cubierta media a las 0 hs y la medida a las 16 hs. Los resultados se expresaron como las veces de cambio del cerramiento de la herida a las 16 hs (T16) con respecto al control sin tratar.

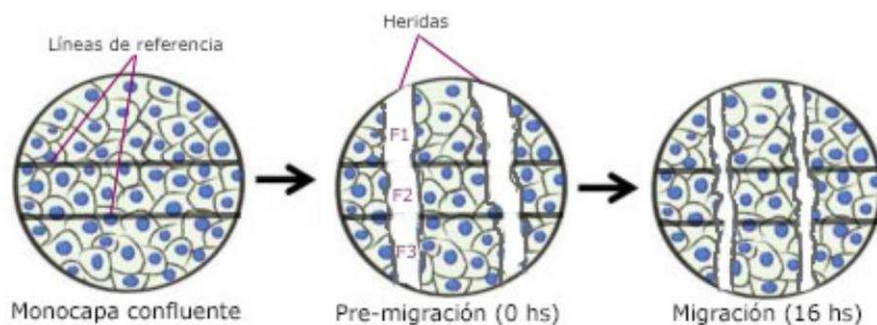


Figura MyM-2. Esquema del ensayo de migración por “cicatrización de herida”. Se indican las líneas horizontales de referencia, así como las 2 heridas realizadas por pocillo. F1, F2 y F3 corresponden a las fotos 1, 2 y 3 tomadas por cada herida, respectivamente. Se observa cómo se modifica el ancho de la herida, luego de un estímulo positivo.

5.1.2. Ensayo de migración a través de cámaras transwell.

Se utilizaron placas de 24 pocillos conteniendo 12 cámaras *transwell* con membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 8 μm . En primer lugar, se realizó un *coating* en ambos lados de las membranas con una solución 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colágeno de cola de rata, preparada de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Roche, Basel, Switzerland). Luego, se colocó la placa en la estufa a 37°C durante 2 hs. Se retiró la solución de colágeno, y se realizaron dos lavados con PBS en ambos lados de la membrana.

Para el estudio de motilidad celular, se partió de células MDA-MB-231 sembradas en medio completo. Una vez alcanzado el 60% de confluencia, se las hambreó en medio con 1% de SFB durante 24 h. A continuación, se levantaron las células con tripsina y se las lavó para eliminar los restos de SFB. El pellet se resuspendió en medio libre de SFB. Posteriormente, se sembraron 80.000 células en 250 μl en la cámara superior de cada *transwell*. En la cámara inferior, se colocaron 500 μl de medio sin SFB, salvo en una de ellas en la cual se colocó medio con 10% de SFB (control positivo). Las células se estimularon con AngII, Ang-(1-7) o ambas (*Cultivo de líneas celulares: Tratamientos*), utilizándose como control negativo células sin tratar. Finalmente, se las incubó a 37°C durante 20 h.

Luego del tiempo de incubación indicado, se removieron aquellas células que no fueron capaces de migrar, utilizando un hisopo embebido en PBS. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS en la cámara superior del *transwell* y se retiró el medio de la cámara inferior. Se procedió con la fijación de las células que migraron en PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con PBS, las células se tiñeron con una solución de Cristal Violeta 0.1% durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron dos lavados

con H₂O destilada, y se retiró el exceso de colorante del compartimento superior con ayuda de un hisopo embebido en H₂O destilada. Una vez secos, se tomaron imágenes de 5 campos al azar de cada uno de los *transwells*, utilizando una cámara fotográfica asociada a un microscopio invertido óptico de campo claro. Se contó el número de células por campo, utilizando el programa *ImageJ 1.37v*. Los resultados se expresaron como el número de células tratadas que migraron por campo.

Para evaluar la capacidad invasora de esta línea celular, se introdujeron las siguientes modificaciones al protocolo recién detallado: se colocaron 40 μ l de *Matrigel* soluble (Corning, NY, USA) 0,3 mg/ml en PBS frío en la cámara superior de cada *transwell*, y se los dejó secar bajo el flujo laminar durante aproximadamente 5 h. Luego, se rehidrataron los *transwells* con medio sin SFB durante 2-3 h a 37°C. Con respecto a las células, únicamente se varió el número de células sembradas por *transwell*, el cual fue de 150.000 en lugar de 80.000.

5.2. Transición Epitelio Mesenquimal (TEM).

Este ensayo se llevó a cabo en la línea celular NMuMG/E9, ampliamente utilizada para llevar a cabo este tipo de ensayos, por su capacidad para adoptar características mesenquimales a las 24 hs del tratamiento con TGF- β (Maeda et al., 2005).

Se sembraron 50.000 células en placas de 6 pocillos con medio completo. A las 24 hs, se realizó un hambreado ON en medio con 2% de SFB, para finalmente lavar las células con PBS y pasarlas a un medio con 1% de SFB. A continuación, se estimularon las células con AngII, Ang-(1-7) o ambas, tal como se detalló previamente (*Cultivo de líneas celulares: Tratamientos*). Se utilizó TGF- β como control positivo de la TEM. A las 72 hs, se cosecharon las células, y se procedió a la extracción de ARN total con Tri-Reagent, como se describió anteriormente. El ARN obtenido, fue utilizado para evaluar la posible modulación de genes involucrados en el mantenimiento del fenotipo epitelial, tales como E-cadh, y en el fenotipo mesenquimal, tales como Fibronectina, N-cadh y α -SMA. Para ello, se empleó la técnica *RT-qPCR* ya descripta.

5.3. Ensayo de proliferación.

Se empleó el ensayo de MTS, cuyo nombre se debe a la sal de tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolium], la cual es biorreducida por la células a un producto coloreado soluble en el medio de cultivo, llamado formazán (Cory et al., 1991). Se utilizó el *kit Cell Titer 96*

Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). En primer lugar, se realizó una curva de titulación para optimizar el número de células necesarias para el ensayo. Se partió de células MDA MB-231 en fase logarítmica de crecimiento, y se sembraron entre 500 y 7000 células por pocillo de una placa de 96, en medio completo. La curva se realizó por sextuplicado. A las 24 hs, se hambreadon las células en medio con 2% de SFB y, al día siguiente, se las incubó en medio sin SFB por 24 hs. Luego, se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se descartó el medio de cultivo y se agregaron 50 µl de medio fresco + 10 µl de MTS por pocillo. Se cubrió la placa de la luz, y se la incubó a 37°C, realizándose mediciones a 450 nm en un lector de ELISA (*Glomax Multi Detection System*, Promega). Una vez determinado el número de células (3000/pocillo), se siguió el mismo procedimiento, pero agregando los estímulos correspondientes (AngII, Ang-(1-7) o ambas; *Cultivo de líneas celulares: Tratamientos*) en medio libre de SFB, luego de las 24 hs de hambreado. Se utilizaron células sin tratar como control negativo del experimento.

6. Estudios morfológicos e histológicos.

Los fragmentos de glándulas mamarias fijados en 10% de formalina neutra, fueron embebidos en parafina. El taco de parafina fue posteriormente seccionado, en láminas de aproximadamente 4 micrones de espesor, utilizando un micrótopo, y fijados a un porta-objetos utilizando procedimientos estándar. Los aspectos morfológicos se evaluaron sobre cortes teñidos con hematoxilina-eosina (H&E).

Para el análisis de la matriz extracelular, se utilizó la tinción *Tricrómico de Masson*, en donde el tejido conectivo fue teñido de color azul, los núcleos en rojo oscuro/púrpura, y el citoplasma en rojo/rosa.

En todos los casos, los cortes fueron observados y analizados por microscopía óptica (Microscopio Olympus CX31), y tanto el análisis morfológico como inmunohistoquímico fue realizado con la ayuda y supervisión del Dr. Roberto Meiss, médico patólogo de la sección IIHEMA-IEO de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

6.1. Inmunohistoquímica (IHQ).

En primer lugar, los tejidos fueron desparafinados y posteriormente rehidratados en concentraciones decrecientes de etanol (100, 96, 85, 70, 50, 30% hasta H₂O destilada). Luego, se procedió al bloqueo de la actividad de las peroxidases endógenas, incubando los cortes durante 30' en una solución al 3% de

H₂O₂ en metanol. A continuación, se bloquearon los preparados en 5% de suero normal de cabra durante 30 minutos en cámara húmeda. Posteriormente, se procedió con la recuperación antigénica, incubando los cortes en el microondas durante 10 minutos en PBS. Finalmente, se los incubó durante 24 hs a 4°C con uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-STAT3 (**Tabla MyM-1**) y anti-Caspasa-3 clivada (*D175-cleaved caspase 3*, catalog no. 9661; Cell Signaling Technology, MA, USA; dilución 1:100). Este último ensayo, fue realizado por la Dra. Andrea Pozzi. La inmunodetección de los anticuerpos primarios se efectuó mediante el empleo del kit *Vectastain Elite ABC* (Vector Laboratories Inc., Burlington, CA), de acuerdo al protocolo provisto por el fabricante. Entre cada uno de los pasos, se realizaron lavados en PBS de los preparados. La localización de la marca positiva, correspondiente cada uno de los anticuerpos ensayados, se detectó por exposición a 3,3'-diaminobencidina (DAB; Dako Cytomation, CA, USA), previamente activada con H₂O₂. El tiempo de incubación fue de entre 2 a 5 minutos, hasta observar que el tejido tomaba un tono amarronado. Para contrarrestar la marca positiva, los preparados fueron teñidos con hematoxilina (BIOPUR, Argentina), y finalmente montados con un medio de montaje sintético para microscopía óptica (*Permount*). Como control de especificidad de la señal obtenida, se omitió el uso de anticuerpo primario en uno de los cortes de cada preparado, reemplazándolo por PBS.

El patrón de inmunodetección para STAT3 se realizó en imágenes a 400X de aumento, contando un total de 1000 células por preparado, indicando la proporción de células marcadas. Se asume que STAT3 se encuentra activo cuando detectamos su marca en el núcleo.

6.2. Técnica de TUNEL.

Luego de la desparafinización y rehidratación de los tejidos en concentraciones decrecientes de etanol, se los incubó en una solución 0,85% de NaCl durante 5 minutos. Se los lavó en PBS y, posteriormente, se realizó una fijación en formalina 10% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la detección de células apoptóticas, se utilizó el *kit Dead End Colorimetric TUNEL System* (Promega). Los reactivos proveídos por el mismo se marcan entre comillas.

En primer lugar, se realizó un tratamiento con "*Proteinasa K*" en una concentración final de 20 µg/ml en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Este paso ayuda a permeabilizar los tejidos. Luego de un nuevo lavado en PBS por 5 minutos, las muestras fueron fijadas nuevamente en formalina 10% en PBS durante 5 minutos. A continuación, se realizó una incubación en

“*Equilibration Buffer*” durante 10 minutos, para luego realizar una incubación de 1 hora a 37 °C con una solución que constaba de: “*Equilibration Buffer*”, “*Biotinylated Nucleotide Mix*” y “*rTdT*” (*Recombinant Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*), en una relación 98:1:1. La incubación se realizó en cámara húmeda a 37 °C y para evitar la evaporación de la solución, se colocó un cubreobjetos sobre cada tejido, lo cual también garantiza una distribución pareja del reactivo. De esta forma, los fragmentos de ADN de células apoptóticas, se marcaron en su extremo 3'-OH, tras la incorporación de nucleótidos biotinilados por la rTdT. Para detener la reacción, se realizó un tratamiento a base de sales utilizando una dilución 1:10 de la solución “20X SSC” durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en PBS de 5 minutos cada uno. A continuación se prosiguió a inhibir la peroxidasa endógena, para lo cual se realizó una incubación de 5 minutos en una solución 0,3% de H₂O₂ en PBS. Se trató a los preparados con una dilución 1/500 de “*Streptavidin HRP*” en PBS durante 30 minutos y luego se realizaron dos lavados en PBS de 5 minutos cada uno. Al igual que en la inmunohistoquímica, el revelado se realizó utilizando una solución de DAB provista en el *kit*, a la cual se la dejó reaccionar durante unos minutos, hasta observar un color amarronado en el preparado bajo microscopio. Para contrarrestar la marca positiva, se realizó una tinción con hematoxilina, para finalmente montar los preparados y analizarlos por microscopía óptica. Como control de especificidad de la señal obtenida se omitió el uso de la enzima rTdT en uno de los cortes de cada preparado, reemplazándolo por agua destilada.

El grado de apoptosis se evaluó contando ≥ 1200 células distribuidas en ≥ 10 campos escogidos al azar, en imágenes a 400X de aumento. El porcentaje de células apoptóticas se calculó para cada sección.

6.3. Inmunofluorescencia (IF).

6.3.1. Líneas celulares.

Para el estudio de la expresión de los marcadores de TEM E-cadh y FN en la línea celular NMuMG, se sembraron 5000 células en placas de 12 pocillos (Corning, NY, USA) sobre cubreobjetos, previamente esterilizados bajo luz UV. El tratamiento que recibieron las células a continuación, se encuentra detallado en el apartado *Ensayo de Transición Epitelio Mesenquimal (TEM)*. Luego de las 96 hs de tratamiento, los vidrios fueron transferidos a una placa de 12 pocillos limpia, e inmediatamente fijados durante 20 minutos en PFA al 4% en PBS. A continuación, se les realizaron dos lavados con PBS, y se las incubó durante 15 minutos en una

solución 0.1% Tritón X-100 en PBS. Luego, se procedió con el bloqueo en una solución 5% de BSA, 0.025% Tritón X-100 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se las lavó con PBS-0.025% Tritón X-100 (PBST-T) y se las incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. En este caso, se utilizaron los anticuerpos primarios anti-E-cadh y anti-FN (**Tabla MyM-5**). Ambos anticuerpos se diluyeron en una solución conteniendo 3% de BSA/PBS-T. Se realizó un control de isotipo, incubando las células con el vehículo en el cual se prepararon los anticuerpos primarios. A continuación, las células se incubaron con anticuerpos secundarios específicos conjugados al fluoróforo *Alexa 568 o 488* (**Tabla MyM-6**), diluidos en solución 3% de BSA en PBS-T. Luego, se realizó una tinción con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 10 minutos, a fin de observar los núcleos celulares, y se montaron los vidrios sobre porta-objetos con una solución de glicerol 80 % en PBS. Finalmente, los preparados fueron observados en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX-81), y se obtuvieron imágenes a un aumento de 400X, utilizando diferentes parámetros que me permitieran realizar un análisis comparativo entre las mismas. Se utilizó el programa *MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis Software* para el análisis de las imágenes.

Tabla MyM-5. Listado de anticuerpos primarios utilizados para IF.

Anticuerpo	Especie	Proveedor	Nº de Catálogo	Dilución
anti-AT1 (N-10)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-1173	1:100
anti-AT2 (H-143)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-9040	1:100
anti-AGT (N-10)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-7419	1:100
anti-E-cadherin/CDH1 (ECCD-2)	Rata	Zymed – Thermo Scientific	13-1900	1:2000
anti-Fibronectina (FN)	Conejo	Gibco-BRL	-	1:100

Tabla MyM-6 Listado de anticuerpos secundarios utilizados para IF.

Anticuerpo	Especie	Proveedor	Catálogo	Dilución
anti-cabra FITC †	Conejo	Jackson Immunoresearch	305-095-003	1:100
anti-conejo DyLight 488 †	Cabra	Jackson Immunoresearch	111-485-045	1:100

anti-rata <i>Alexa Fluor 568</i> §	Cabra	Thermo Scientific	A-11011	1:400
anti-conejo <i>Alexa Fluor 488</i> §	Cabra	Thermo Scientific	A-11006	1:400

‡ Utilizados en los ensayos realizados en cortes de tejido mamario.

§ Utilizados en los ensayos realizados en células NMuMG.

6.3.2. Tejido mamario.

Se colocó un fragmento de aproximadamente 0.5 cm de glándula mamaria recién extraída, en cada pocillo de una placa de 12, y se llevó a cabo la inclusión en *O.C.T Compound (Optimal Cutting Temperature Compound, Sakura Finetek, CA, USA)*. Inmediatamente después, se colocó el tejido a -80°C durante el tiempo necesario para su congelamiento. A continuación, se removieron los tacos y se realizaron cortes con un criostato, obteniéndose cortes de 10-12 μm de espesor. Los cortes fueron secados al aire y fijados durante 20 minutos en 10% de formalina en PBS. Posteriormente, se los bloqueó en una solución 2% de SFB en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se analizó la expresión de AT1-R, AT2-R y AGT, utilizándose los anticuerpos primarios detallados en la **Tabla MyM-5**, diluidos en *buffer* de bloqueo. Asimismo, se realizó una marcación con un anticuerpo anti-E-cadh, para identificar las células epiteliales. Luego de 3 lavados en PBS, los cortes fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos secundarios, conjugados con *Fluoresceína (FITC)* o *DyLight* y diluidos 1:100 en *buffer* de bloqueo. Posteriormente, se lavaron los cortes con PBS, y se realizó una tinción nuclear con DAPI, para finalmente montar los cortes con *Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)*. El análisis se realizó bajo un microscopio confocal laser (*Nikon, Tokyo, Japan*), en imágenes a 1000X de aumento. Este ensayo fue realizado en colaboración con la Dra Marina Simian del Instituto “Ángel Roffo”.

7. Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar (SEM), y posteriormente sometidos a un análisis estadístico empleando el programa *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, USA). Dependiendo del diseño experimental, se aplicó un análisis de varianzas (*one-way ANOVA*) seguido de la prueba *post hoc Tukey*, o un análisis *t-student* cuando se trataba de una comparación entre dos muestras. La significancia estadística se definió en un valor de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Capítulo 1.

1. Rol de la AngII y de los componentes del RAS en la involución mamaria post-lactancia.

1.1 Análisis de la expresión de los componentes del RAS en la glándula mamaria normal de ratón.

Cuando me incorporé al laboratorio en el año 2010, las contribuciones acerca de la existencia de un RAS tisular en la glándula mamaria eran muy escasas (Tahmasebi et al., 2006; Vinson et al., 2012). En primer lugar, comenzamos estudiando *in vitro* la expresión de los receptores de AngII, AT1-R y AT2-R, en la línea celular epitelial mamaria HC11. En este sentido, realizamos ensayos de *PCR* estándar con *primers* específicos para ambos receptores (ver sección de *Materiales y Métodos*, **Tabla MyM-3**), a partir de extractos de ARN total de cultivos celulares HC11. De esta forma, demostramos que dichas células, expresan tanto AT1-R como AT2-R a nivel transcripcional (**Figura R-1A**). Asimismo, corroboramos la expresión proteica de ambos receptores en dicha línea celular, a través de ensayos de *Western blot* con anticuerpos específicos (ver sección de *Materiales y Métodos*, **Tabla MyM-1**) (**Figura R-1B**). Como control positivo de expresión de los receptores, se utilizaron muestras de proteínas y de ARNm de tejido hepático o testicular de ratones normales.

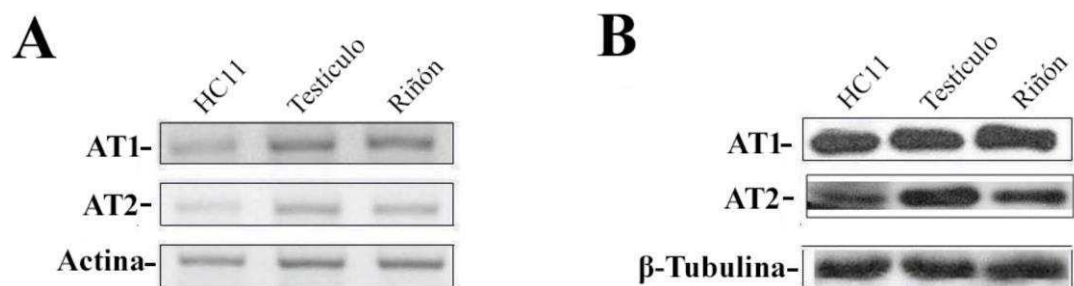


Figura R-1. Expresión de los receptores de AngII en la línea celular epitelial mamaria HC11. (A) Análisis de los niveles de ARNm de AT1-R y AT2-R, a través de ensayos de *RT-PCR*. **(B)** Análisis del perfil proteico de AT1-R y AT2-R mediante ensayos de *Western blot*. En ambos casos, se utilizaron muestras de tejido murino de testículo y riñón, como controles positivos. Se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo, de un total de 3 realizados de manera independiente.

Por otro lado, la Dra. Nahmod de nuestro grupo, detectó mediante ensayos de inmunofluorescencia de células HC11, una tinción positiva para AT1-R, AT2-R y AGT. Resulta relevante destacar que, en todos los casos analizados, se observaron mayores niveles de expresión de AT1-R que de AT2-R, independientemente de la técnica empleada.

1.1.1 Análisis de la expresión del RAS durante la involución mamaria.

Con el objeto de esclarecer el rol que podría ejercer AngII *in vivo*, en un primer set de experimentos, decidimos evaluar la modulación de la expresión de los componentes del RAS, en tejido mamario extraído de hembras de la cepa Balb/c durante las fases de lactancia, involución temprana (días 1-4 postdestete) e involución tardía (días 5-8 postdestete). Se determinaron los niveles de expresión de AT1-R, AT2-R, AGT y ECA, mediante PCR en tiempo real (*RT-qPCR*), utilizando *primers* específicos (ver sección de *Materiales y Métodos*, **Tabla MyM-4**) (**Figura R-2**). Los resultados obtenidos muestran que la expresión de AT1-R aumenta de forma gradual, comenzando a las 24 hs del retiro de las crías, y sosteniéndose dicho patrón durante las próximas 96 hs [10 veces de cambio *vs* control; $P < 0.01$]. Con respecto a AT2-R, el incremento en los niveles de ARNm fue más tardío que el de AT1-R, detectándose un incremento significativo de los mismos recién a las 96 hs del retiro de las crías [6.2 veces de cambio *vs* control; $P < 0.01$]. En cuanto al ARNm de AGT, observamos un aumento significativo a las 48 hs, con un nivel de expresión aún superior a las 96 hs [6.2 veces de cambio *vs* control; $P < 0.01$]. Por otro lado, ECA mostró un incremento muy rápido en su expresión, encontrándose su pico máximo a las 6 hs del retiro de las crías [5.7 veces de cambio *vs* control; $P < 0.01$].

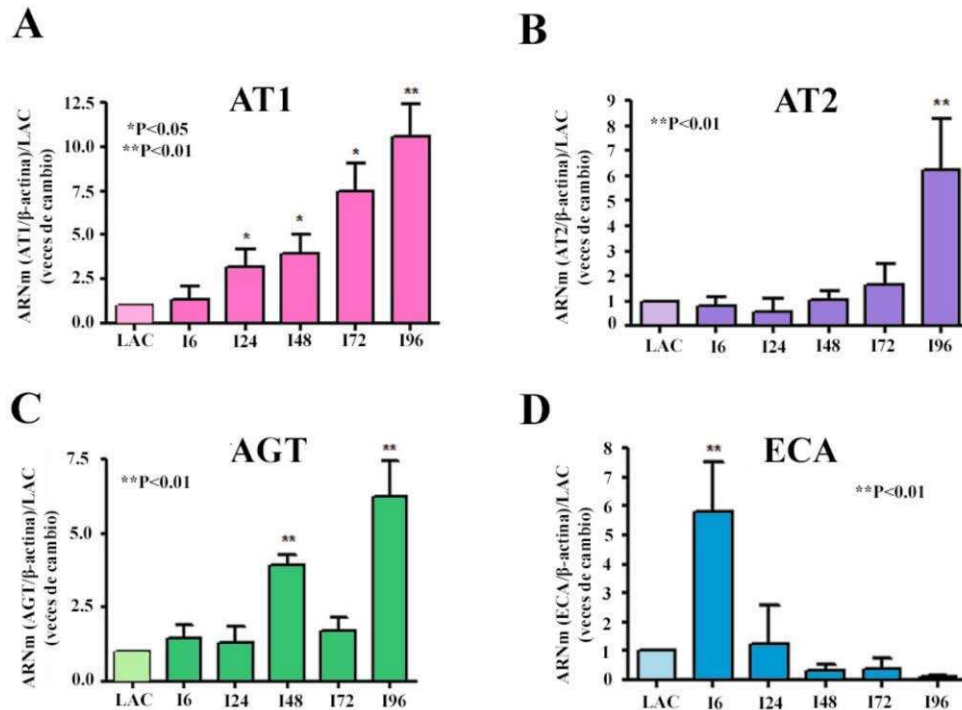


Figura R-2. Patrón de expresión de los componentes del RAS en glándulas mamarias de ratones en fase de lactancia e involución. Análisis de los niveles de ARNm de (A) AT1-R; (B) AT2-R; (C) AGT; (D) ECA mediante *RT-qPCR*, a partir de ARN extraído de glándulas mamarias cosechadas a distintos tiempos durante lactancia e involución. Los niveles de ARNm se expresaron como unidades arbitrarias, los cuales fueron normalizados a β-actina y relativizados a lactancia. Las barras indican la media ± SE; n ≥ 4. [* P < 0.05; ** P < 0.01 involución vs lactancia].

Asimismo, corroboramos los niveles de expresión de AT1a-R en los distintos estadios de involución, mediante un ensayo de protección a RNAsas (RPA). A través del mismo, detectamos un aumento en la expresión de dicho receptor a las 72-96 hs de iniciada la involución (**Figura R-3**). Cabe destacar, que este ensayo fue realizado durante mi estadía en Alemania en el año 2011 en el marco de una colaboración con el laboratorio del Dr. Thomas Walter.

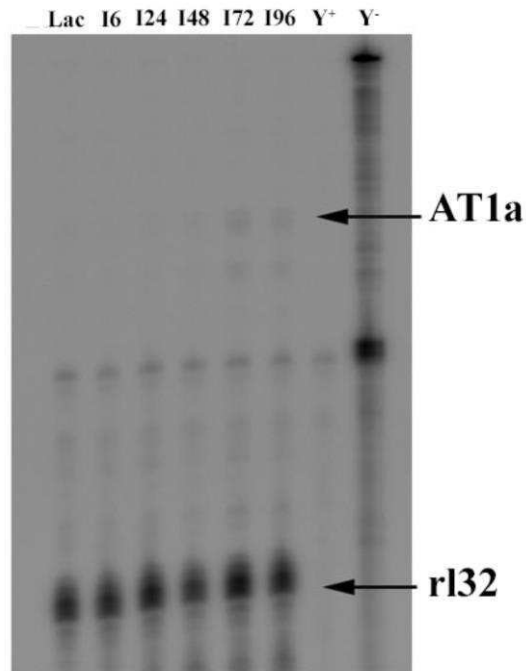


Figura R-3. Expresión del receptor AT1-R mediante un ensayo de protección a RNAsas (RPA), en glándulas mamarias de ratones en fase de lactancia e involución. Se extrajo ARN de glándulas mamarias cosechadas a distintos tiempos. En cada experimento, se agrupó el ARNm de 3 glándulas mamarias correspondientes a experimentos independientes, en cada uno de los tiempos estudiados (lactancia e involución 6, 24, 48, 72 y 96 hs). Se utilizó la sonda r132 como control de carga. Los resultados corresponden a un gel representativo de los 2 realizados. Y+: ARN de levadura con RNAsa; Y-: ARN de levadura sin RNAsa.

Por último, en colaboración con la Dra. Simian del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, analizamos el patrón de expresión de AT1-R, AT2-R y AGT, a través de inmunofluorescencia y microscopía confocal, de glándulas mamarias de ratón en fase de lactancia, y a las 48 y 96 hs de involución. Los tejidos fueron congelados, cortados mediante un crióstato, y luego fijados y bloqueados (para mayor detalle, ver sección 5.3 *Inmunofluorescencia de Materiales y Métodos*). Asimismo, se emplearon anticuerpos específicos para cada una de las proteínas analizadas (ver sección de *Materiales y Métodos*, **Tabla MyM-1**). Los resultados obtenidos muestran, en concordancia con los anteriormente detallados, que existe un incremento en la marcación correspondiente a AT1-R, AT2-R y AGT, tanto en células epiteliales como en adipocitos específicamente durante la involución (**Figura R-4**).

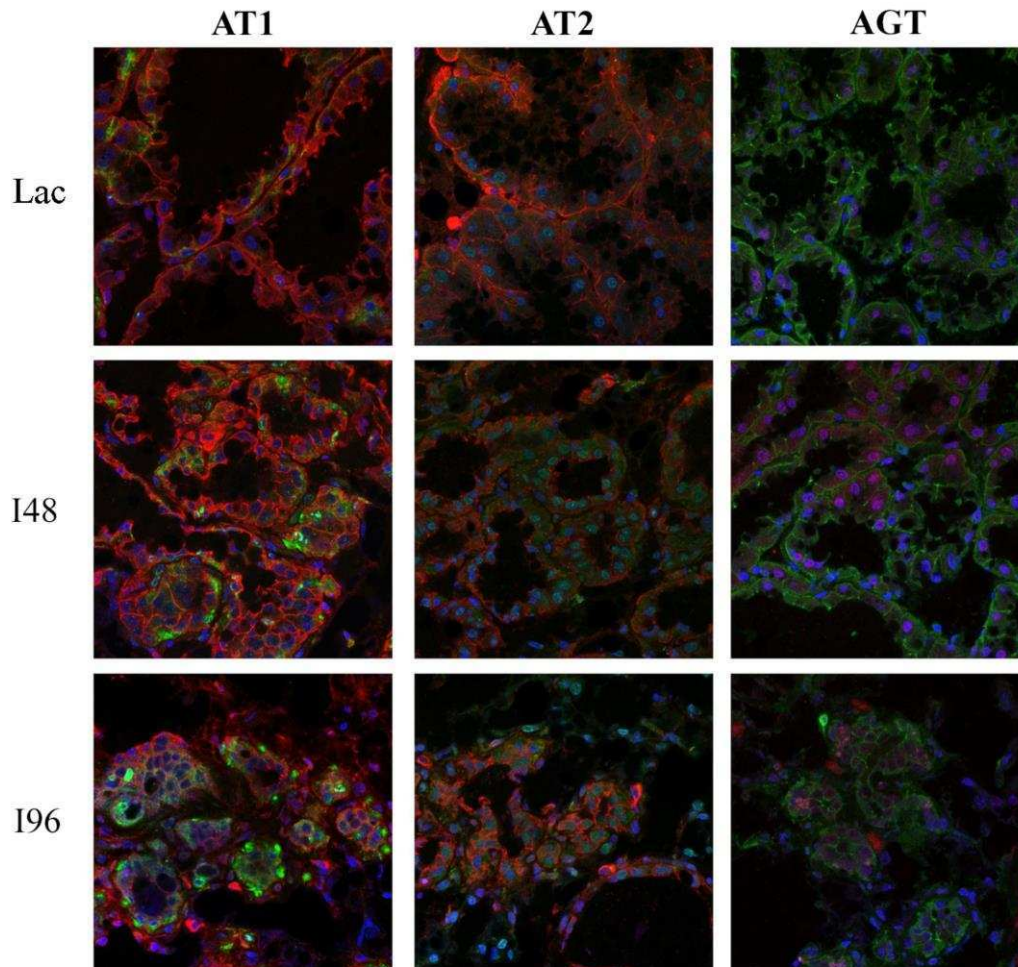


Figura R-4. Inmunolocalización de los componentes del RAS en glándulas mamarias en fase de lactancia e involución. Análisis por inmunofluorescencia (IF) de la expresión de AT1-R, AT2-R y AGT, en cortes histológicos de glándulas mamarias en fase de lactancia y en involución 48 y 96 hs. Las muestras se congelaron y se cortaron mediante un crióstato. Luego, se fijaron, se bloquearon y se las incubó con el anticuerpo primario correspondiente, para finalmente incubarlas con un anticuerpo secundario apropiado. Se utilizó la marcación con E-cadherina para identificar células epiteliales (AT1 y AT2: verde, E-cadherina: rojo; y AGT: rojo, E-cadherina: verde; núcleos teñidos con DAPI: azul). Los cortes se analizaron por microscopía confocal láser (Aumento 100X). Se muestra un experimento representativo de los 3 realizados.

A través de los resultados obtenidos, se ha descrito la existencia de un patrón de expresión definido de los componentes del RAS durante la involución mamaria post-lactancia.

1.2. AngII induce la activación de STAT3 en la glándula mamaria lactante de ratón.

Una de las principales características de la primera fase de la involución mamaria post-lactancia, es la apoptosis de células secretoras. La activación del factor de transcripción STAT3, y su consecuente translocación al núcleo, cumplen un rol clave en la inducción de dicho proceso. Luego de haber demostrado, que los receptores encargados de mediar los efectos de AngII aumentan su expresión durante la involución, decidimos estudiar si AngII es capaz de inducir los principales eventos asociados a la fase temprana de involución. Para ello, utilizamos ratones inoculados con AngII en fase de lactancia, ya que en dicho período los niveles de activación de STAT3 y apoptosis permanecen prácticamente indetectables. Anteriormente, la Dra. Nahmod y la Dra. Fernández de nuestro laboratorio, encontraron que la inyección de AngII inducía la rápida activación de STAT3 en mamas en fase de lactancia, demostrando por primera que AngII era capaz de inducir la activación de STAT3 en el epitelio mamario *in vivo*. Al ingresar al laboratorio, dada la relevancia de dicho resultado, decidimos incrementar el número de réplicas y profundizar el rol de AngII como factor local, en el epitelio mamario (**Figura R-5A y B**).

A continuación, estudiamos si la activación de STAT3 mediada por AngII, ocurría a través del receptor AT1-R, siendo éste el responsable de la mayor parte de los efectos provocados por dicho péptido. Para ello, co-inyectamos AngII 10^{-6} M por vía intramamaria junto con irbesartan 10^{-5} M (antagonista específico de AT1-R), en mamas de hembras en fase de lactancia. A modo de control, y para excluir la posibilidad de que STAT3 se active por distensión tisular, se inyectó NaCl 0.9% por vía intramamaria, en la mama contralateral del mismo ratón. Luego de 30 minutos, se extrajeron las mamas, se prepararon extractos proteicos, y finalmente se realizó una inmunoprecipitación, utilizando un anticuerpo específico para STAT3 y revelando con un anticuerpo anti pSTAT3 (ver sección de *Materiales y Métodos*, Tabla MyM-1). Como control positivo de activación de STAT3, se utilizaron muestras provenientes de mamas de hembras con 24 hs de involución. Como puede observarse en la **Figura R-5C**, en presencia de irbesartan, la fosforilación de STAT3 inducida por AngII disminuye notablemente con respecto al tratamiento con AngII solamente.

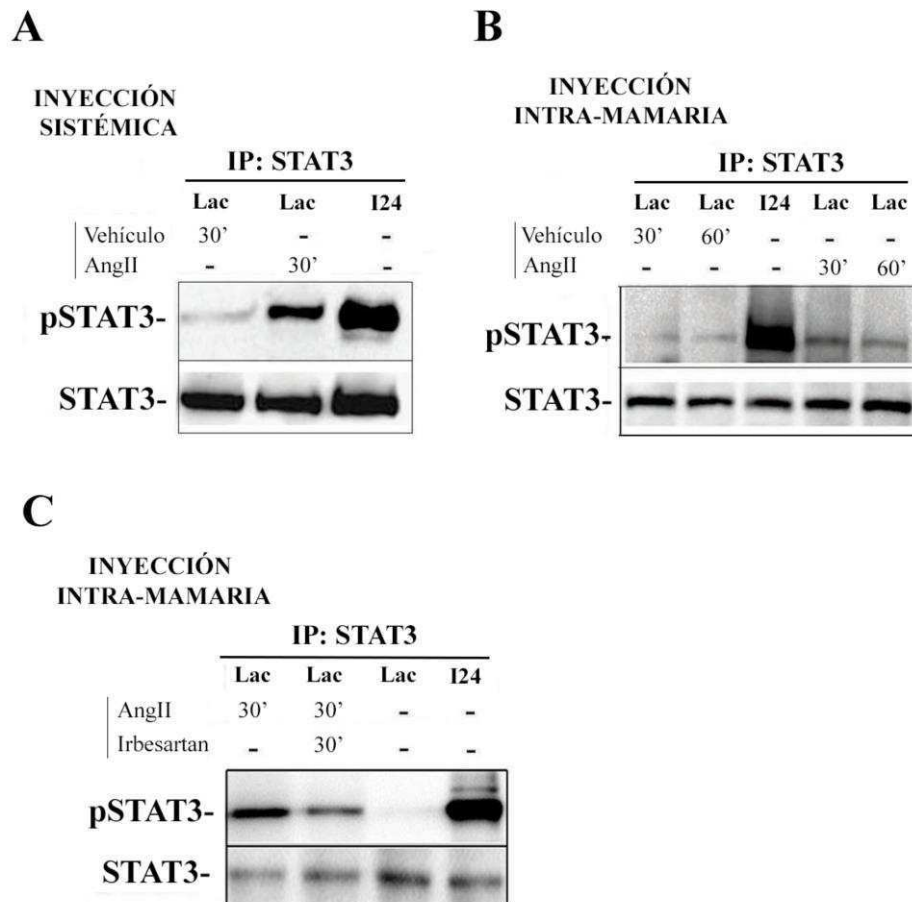


Figura R-5. AngII induce la activación de STAT3 en glándulas mamarias provenientes de ratones lactantes. Se inyectaron ratones Balb/c en fase de lactancia con AngII o vehículo por vía sistémica en el lomo (**A**) o por vía intramamaria (**B**); o con AngII o AngII + irbesartan por vía intramamaria (**C**), durante el tiempo indicado. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) y *Western blot* de proteínas extraídas de glándulas mamarias, para analizar la expresión de pSTAT3 y STAT3 a través de sus correspondientes anticuerpos primarios. Se utilizaron glándulas mamarias a 24 hs de involución como control positivo de activación de STAT3. Los resultados corresponden a un experimento representativo de los 3 experimentos independientes realizados. *Los resultados preliminares de las figuras A y B, formaron parte de la tesis de grado de la Dra. Natalia Fernández.*

Por último, continuamos trabajando sobre la localización subcelular de STAT3, a partir de un resultado preliminar obtenido por la Dra. Fernández en el marco de su tesis de licenciatura. Mediante ensayos de inmunohistoquímica, a partir de cortes histológicos provenientes de tejido mamario de hembras en estadio de lactancia, tratadas localmente con AngII o NaCl 0.9% la Dra. Fernández mostró la presencia de marca positiva de STAT3 a nivel nuclear, indicando la translocación al núcleo de dicho factor de transcripción en el epitelio mamario y, por ende, su activación. La importancia de dicho resultado, nos condujo a realizar nuevas inmunohistoquímicas, con el objetivo de corroborar el hallazgo de la Dra. Fernández. En cada uno de los ensayos, incluimos cortes de glándulas mamarias

lactantes no inyectadas y de glándulas mamarias en involución 24 hs, como control negativo y positivo respectivamente. En la **Figura R-6**, se ilustra a través de fotografías representativas, la activación de STAT3 mediada por AngII. Se observa un claro aumento en el porcentaje de núcleos marcados (señalados con flechas), en las glándulas tratadas con AngII en comparación con las que recibieron NaCl 0.9%.

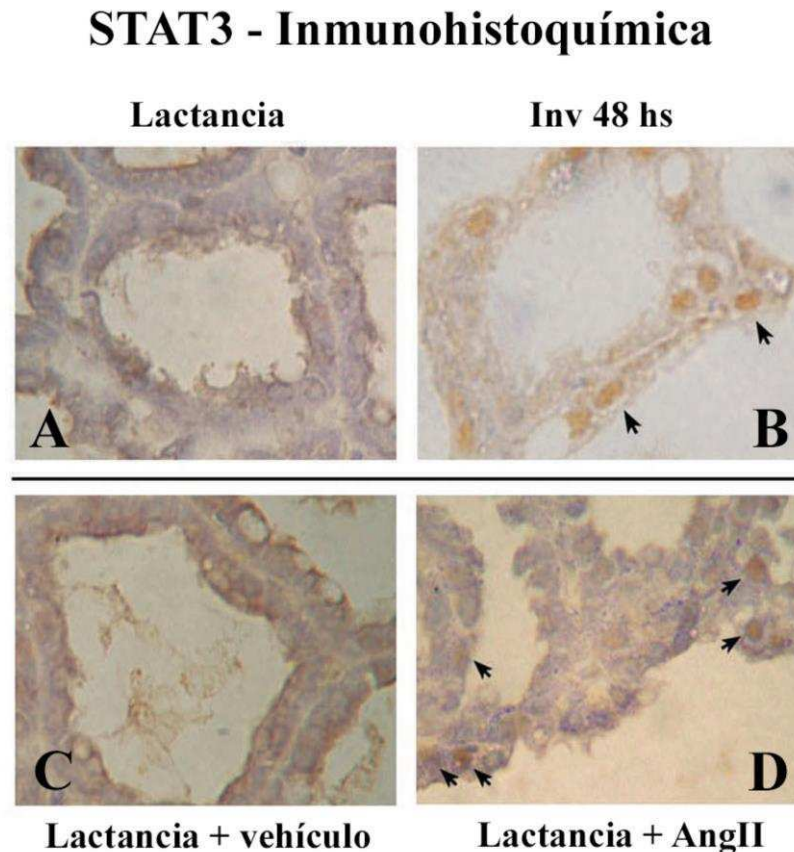


Figura R-6. Efecto de AngII sobre la localización subcelular de STAT3 en células epiteliales provenientes de glándulas mamarias en fase de lactancia. Inmunohistoquímica (IHQ) de cortes histológicos marcados con un anticuerpo anti-STAT3, provenientes de glándulas mamarias lactantes tratados con AngII (**D**) o vehículo (**C**). Se utilizaron cortes extraídos de ratones en fase de lactancia (**A**) e involución 48 hs (**B**) sin inyectar, como controles negativo y positivo respectivamente. Las flechas indican una translocación positiva de STAT3 al núcleo. Los resultados muestran un experimento representativo de un total de 3 realizados. *Los resultados preliminares correspondientes a esta figura, se incluyeron en la tesis de grado de la Dra. Natalia Fernández.*

Los resultados obtenidos en torno a la activación de STAT3 por AngII son de gran importancia, dado que hasta el momento el LIF era el único factor descrito como responsable de la activación de STAT3 en el epitelio mamario.

1.3. AngII induce la activación de ERK1/2 en la glándula mamaria lactante de ratón.

Por otro lado, en los últimos años se ha publicado que la MAPK ERK1/2 presenta altos niveles de activación a las 24 horas de involución mamaria, con respecto a lo observado en hembras en estadio de lactancia (Zhao et al., 2002). A su vez, se demostró que la citoquina LIF induce la fosforilación de ERK1/2 en la glándula mamaria y en la línea celular epitelial HC11 (Kritikou et al., 2003; Quaglino et al., 2007). Respecto a AngII, se ha demostrado su capacidad para inducir la fosforilación de ERK1/2 en diversos tipos celulares y tejidos. Con estos antecedentes, decidimos evaluar la activación de ERK1/2 en glándulas mamarias de hembras en fase de lactancia, tratadas previamente con AngII por vía intramamaria. Bajo las mismas condiciones experimentales que para STAT3, demostramos que AngII induce la fosforilación de ERK1/2, a los 30 min post-tratamiento (**Figura R-7A**). Asimismo, evaluamos si la activación de ERK1/2 también ocurre a través del receptor AT1-R. Efectivamente, observamos una notable disminución de los niveles de fosforilación de ERK1/2, luego de la co-administración de AngII con irbesartan (**Figura R-7B**).

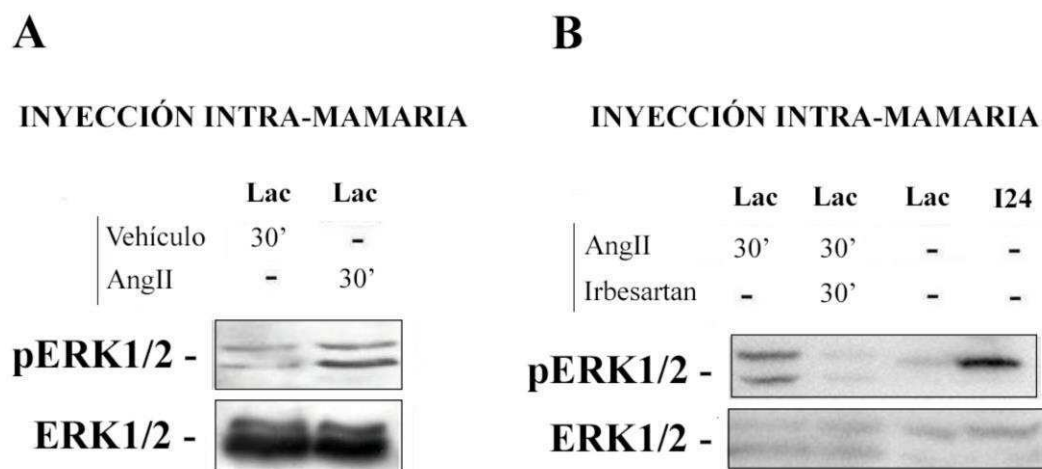


Figura R-7. AngII promueve la activación de ERK1/2 en glándulas mamarias en fase de lactancia. Se inyectaron ratones Balb/c en fase de lactancia por vía intramamaria con **(A)** AngII o vehículo o con **(B)** AngII o AngII + irbesartan, durante el tiempo indicado. Las proteínas extraídas fueron sometidas a ensayos de *Western blot*, para el análisis de la expresión de pERK1/2 y ERK1/2 a través de sus anticuerpos primarios correspondientes. Se utilizaron glándulas mamarias a 24 hs de involución como control positivo de activación de ERK1/2. Los resultados corresponden a un experimento representativo de los 3 experimentos independientes realizados.

1.4. AngII induce la muerte celular programada en el epitelio mamario.

Durante la fase temprana de la involución mamaria, la falta de succión de leche resulta en la inducción de factores locales que desencadenan una apoptosis masiva del epitelio lóbulo-alveolar. Ésta se inicia pasadas las 12 hs del retiro de las crías, y va acompañada de la activación de STAT3, el clivaje de caspasa-3 (Chapman et al., 1999) y la expresión de TNF- α (Clarkson et al., 2004). Por lo tanto, habiendo demostrado que AngII induce activación y translocación de STAT3 al núcleo en células epiteliales de glándulas mamarias en fase de lactancia, estudiamos a continuación si dicho péptido era capaz de desencadenar apoptosis en el epitelio mamario. Para ello, se administró por vía intramamaria AngII 10^{-6} M o NaCl 0.9% en la mama contralateral de hembras lactantes. Luego de 8 hs, se extrajo el tejido mamario y se realizaron cortes histológicos, los cuales fueron utilizados para el análisis de la fragmentación del ADN mediante la técnica de *TUNEL*. En la **Figura R-8**, se exponen fotografías representativas de los cortes, donde puede observarse un aumento de más de tres veces en el porcentaje de núcleos apoptóticos (indicados con flechas) en las mamas tratadas con AngII respecto de las tratadas con NaCl 0.9% [$2.9 \pm 0.5\%$ control vs. $9.6 \pm 1.1\%$ AngII; $P < 0.001$].

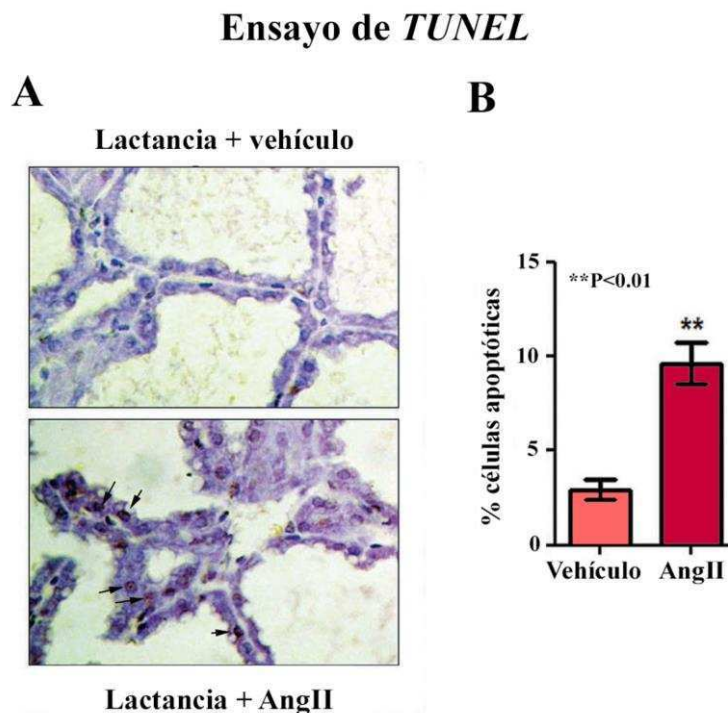


Figura R-8. AngII induce la muerte celular en células epiteliales, provenientes de glándulas mamarias de ratones en fase de lactancia. (A) Análisis por *TUNEL* del nivel de apoptosis de cortes histológicos correspondientes a glándulas mamarias lactantes, previamente tratadas con

AngII o vehículo durante 8 hs. Las flechas indican células apoptóticas (Aumento 400X). **(B)** Los valores que se muestran en el gráfico de barras, representan el porcentaje promedio \pm SE de células teñidas positivamente; n = 3 ratones/grupo; [****** $P < 0.01$ AngII vs vehículo].

En conjunto, estos resultados indican que AngII es un nuevo factor que actúa a nivel local en la mama, induciendo apoptosis y activación de las vías de señalización de STAT3 y ERK1/2 a través de la interacción con su receptor AT1-R. Altos niveles de AngII en la glándula mamaria en fase de lactancia, inducirían eventos claves asociados a la involución.

1.5. El bloqueo de AT1-R resulta en una disminución de los niveles de apoptosis y un retardo en la involución mamaria.

Con el objetivo de definir el rol de la AngII endógena durante la involución, e identificar el receptor a través del cual dicho péptido mediaría sus efectos, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* utilizando los antagonistas losartan y PD123319, específicos del AT1-R y el AT2-R respectivamente. Previamente, la Dra. Nahmod en nuestro laboratorio, había demostrado la presencia de un retardo en la involución mamaria en mamas de ratones tratados con losartan a distintos tiempos de involución (24, 48, 72, 96 y 120 hs). El hallazgo no sólo fue importante, sino también novedoso, con lo cual fue necesario repetir el protocolo sucesivas veces. De esta forma, trabajé junto con la Dra. Nahmod, corroborando y definiendo de forma precisa los fenómenos observados en cada uno de los estadios del proceso de involución. Básicamente, trabajamos con dos grupos experimentales: uno de ellos recibía inyecciones subcutáneas de losartan (20 mg/kg/días) en el lomo, mientras que el segundo grupo recibía NaCl 0.9% (vehículo). Luego de extraído el tejido mamario a los tiempos correspondientes, realizamos cortes histológicos a partir de los mismos, para finalmente teñirlos con H&E. En la **Figura R-9**, se exponen imágenes representativas de un protocolo completo de involución. Durante la primera fase del proceso (24 y 48 hs post-lactancia), tanto las mamas tratadas con losartan como las que recibieron sólo el vehículo, presentaban una histoarquitectura similar. Luego, a las 72 hs del retiro de las crías, observamos que en ambos grupos las glándulas presentaban un extensivo remodelado tisular, caracterizado por el colapso de las estructuras lóbulo-alveolares. Sin embargo, las mamas tratadas con losartan demostraron una mayor persistencia de estructuras alveolares abiertas, así como un retardo en la reaparición de adipocitos,

comparado con el grupo control. Las diferencias entre ambos grupos se hicieron aún más notorias a las 96 hs de involución. El colapso de las estructuras lóbulo-alveolares conteniendo cúmulos de células epiteliales, se hizo evidente en las mamas tratadas con losartan, correlacionándose a su vez con una disminución significativa de la población adipositaria. Las diferencias entre ambos grupos, persistieron hasta las 120 hs del inicio de la involución, corroborando así el retardo en dicho proceso en glándulas tratadas con losartan.

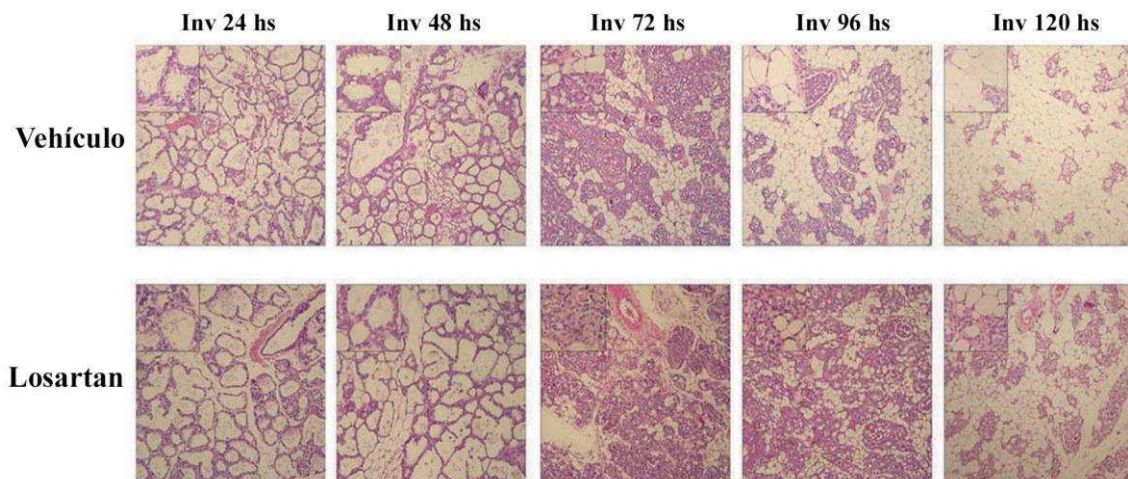


Figura R-9. Histoarquitectura de glándulas mamarias de ratones tratados con losartan durante la involución. Tinciones con H&E, en cortes de tejido mamario de ratones tratados con vehículo (panel superior) o losartan (panel inferior) a distintos tiempos de involución: 24, 48, 72, 96 y 120 hs (Aumento 100X; insertos 400X). Los resultados corresponden a un experimento representativo de un $n > 5$ de experimentos realizados.

Luego, evaluamos la participación del receptor AT₂-R *in vivo*, a través de un protocolo experimental similar al utilizado con losartan. En este caso, se inocularon hembras con el antagonista de AT₂-R PD123319 durante distintos tiempos de involución (24, 48 y 72 hs). A diferencia del tratamiento con losartan, no encontramos diferencias morfológicas significativas en los cortes provenientes de ratones tratados con PD123319, respecto a los que recibieron NaCl 0.9% (resultado no mostrado). De esta forma, confirmamos que los efectos de AngII sobre el epitelio mamario, se desencadenan específicamente a través del AT₁-R.

A continuación, se analizaron los niveles de apoptosis del epitelio mamario durante la involución, luego del tratamiento de las hembras con losartan. Primeramente, se evaluó la morfología de células epiteliales, así como el grado de desprendimiento de las mismas hacia el lumen de los alveolos (*shedding*). Para ello, se utilizaron cortes de tejido mamario en involución 48 hs. Se observó que, en comparación con el control (vehículo), las muestras de glándulas mamarias

tratadas con losartan, presentaban un número significativamente menor de células con morfología apoptótica acumuladas en el lumen de los alvéolos (**Figura R-10**). Esto indicaría, que se produjo una disminución en los niveles de apoptosis específica de las estructuras lóbulo - alveolares.

Shedding de células apoptóticas

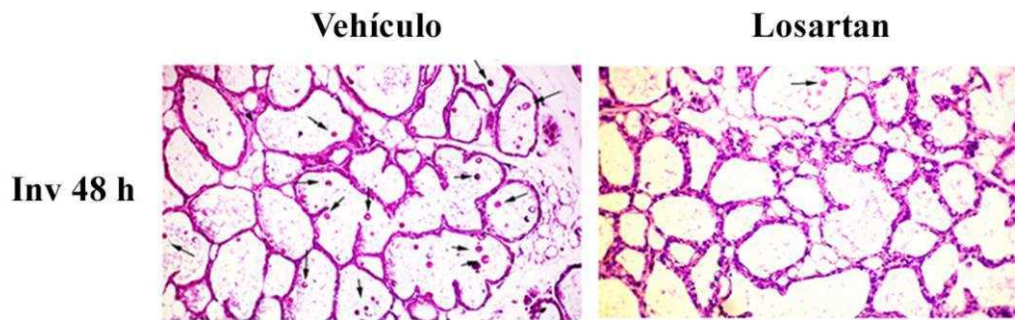
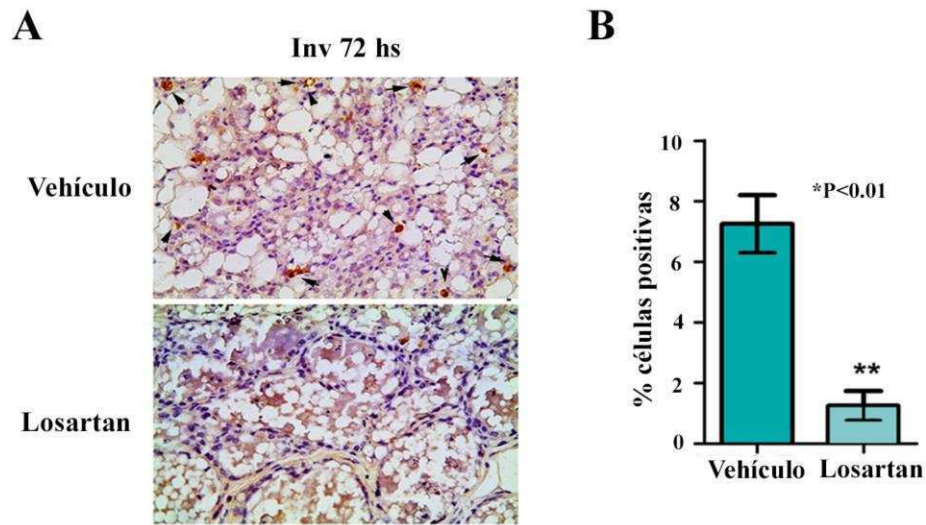


Figura R-10: Análisis del desprendimiento de células epiteliales con morfología apoptótica hacia el lumen de los alvéolos (*shedding*), en glándulas mamarias de ratones tratados con losartan durante la involución. Se utilizaron cortes de glándulas mamarias correspondientes a ratones en involución 48 hs, previamente tratados con losartan o vehículo. Las flechas indican células apoptóticas (Aumento 250X). Los resultados corresponden a un experimento representativo de 3 realizados.

A continuación, se emplearon técnicas inmunohistoquímicas para determinar el porcentaje de células apoptóticas, presentes en ambos grupos experimentales. En primer lugar, se analizó la actividad de caspasa-3 a las 72 hs del retiro de las crías, en mamas tratadas con losartan vs mamas tratadas con NaCl 0.9%. Con la colaboración de la Dra Andrea Pozzi del departamento de Química Biológica de la FCEN, se llevaron a cabo IHQs, utilizando un anticuerpo específico que reconoce la forma activa de caspasa-3. Como era de esperarse, el porcentaje de células marcadas positivamente fue significativamente menor en glándulas mamarias de ratones tratados con losartan, en comparación con aquellos tratados sólo con el vehículo ($P < 0.01$) (**Figura R-11A y B**). En segunda instancia, realizamos ensayos de *TUNEL*, en los cuales nuevamente se observó un porcentaje inferior de núcleos apoptóticos en el grupo experimental que recibió el antagonista [$12.1 \pm 2.1\%$ control vs $4.8 \pm 0.7\%$ losartan; $P < 0.05$] (**Figura R-11C y D**).

Caspasa-3 Clivada - Inmunohistoquímica



Ensayo de TUNEL

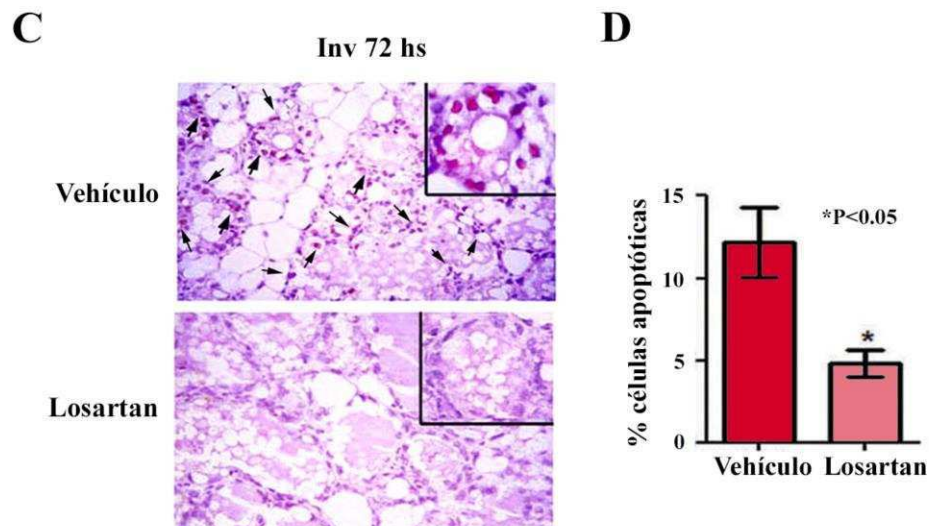


Figura R-11. Losartan inhibe la apoptosis de células epiteliales durante la involución. (A) Inmunohistoquímica (IHQ) de cortes histológicos marcados con un anticuerpo anti-caspasa-3 clivada, obtenidos de glándulas mamarias de ratones en involución 72 hs, tratados con losartan o vehículo. Las flechas indican células positivas para la marcación analizada. **(B)** Análisis por TUNEL del nivel de apoptosis de cortes de glándulas mamarias a 72 hs de involución, provenientes de ratones tratados con losartan o vehículo. Las flechas indican células apoptóticas (Aumento 250X; insertos 400X). Las barras representan el porcentaje promedio \pm SE de células teñidas positivamente para **(B)** caspasa-3 clivada y **(D)** TUNEL; n = 3 ratones/grupo; [* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ losartan vs vehículo].

1.5.1. Efectos del antagonismo del receptor AT1-R en la modulación de la expresión y/o activación de factores locales y de supervivencia durante la involución.

A continuación, nos propusimos identificar los mecanismos moleculares subyacentes al retardo en el proceso de involución y la inhibición de la apoptosis, observadas tras el bloqueo farmacológico de AT1-R. De esta forma, comenzamos estudiando vías de señalización críticas, asociadas a la supervivencia y a desencadenar apoptosis durante la involución.

Anteriormente, se hizo hincapié en la relevancia del factor de transcripción STAT3 durante el proceso de involución (ver sección *Introducción*, 1.3.1. *Vía JAK/STAT: de PRL/JAK/STAT5 a LIF/JAK/STAT3*). Asimismo, se ha destacado la participación de la regulación de la vía de ERK1/2 para el desarrollo normal de la glándula mamaria, principalmente durante la etapa de involución. Por lo tanto, en primer lugar analizamos por *Western blot* los niveles de fosforilación tanto de STAT3 como de ERK1/2, en glándulas mamarias tratadas con losartan a distintos tiempos (24, 48, 72 y 96 hs). Al igual que en los experimentos previos, se emplearon anticuerpos específicos para cada una de las proteínas fosforiladas y totales (ver sección de *Materiales y Métodos*, **Tabla MyM-1**). Como se muestra en la **Figura R-12A**, no se observan alteraciones significativas con respecto a los niveles de fosforilación de los factores pro-apoptóticos STAT3 y ERK1/2, a los distintos tiempos examinados, luego del pre-tratamiento con losartan. En función de estos resultados, evaluamos los niveles de expresión de factores antiapoptóticos tales como BCL-X_L, perteneciente a la familia de BCL-2. Los resultados obtenidos son interesantes, ya que se produjo un fuerte aumento en la expresión de dicho factor a las 24 y 48 hs post-destete, en mamas tratadas con losartan, en comparación con aquellas tratadas únicamente con el vehículo. Por otro lado, AKT ha sido propuesta como una molécula centinela de las señales de supervivencia y muerte en el epitelio mamario. Particularmente en involución, ésta es considerada una potente señal de supervivencia para la glándula mamaria (Schwertfeger et al., 2001) (ver sección *Introducción*, 1.3.2. *Vía PI3K/AKT*). El análisis de los niveles de activación de AKT por *Western blot*, reveló un incremento sustancial a las 24 y 48 hs post-destete, en ratones tratados con losartan.

A continuación, analizamos la expresión de factores locales, tales como LIF y TNF- α , los cuales se liberan en la fase temprana de la involución y activan la vía de apoptosis. Nuestro propósito, fue elucidar si el bloqueo de AT1-R altera los niveles de expresión de genes de respuesta temprana durante involución. Previamente nuestro grupo de trabajo, al igual que el grupo de Christine Watson, identificaron a

LIF como responsable fisiológico de la activación de la vía JAK/STAT3 en el epitelio mamario, al inicio de la involución mamaria post-lactancia (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003). TNF- α , por su parte, es uno de los blancos transcripcionales de NF κ -B y, por ende, un regulador importante de la apoptosis (Baxter et al., 2006). Considerando dichos antecedentes, trabajamos con muestras de ARN extraídas de glándulas mamarias en involución 24 hs, tratadas con losartan o vehículo. A través de *RT-qPCRs*, estudiamos entonces la expresión de ARNm de LIF y TNF- α , utilizando oligonucleótidos específicos (ver sección de *Materiales y Métodos*, **Tabla MyM-4**). Los resultados obtenidos, revelan una inhibición significativa de ambos factores, producidos a nivel local, en las hembras tratadas con losartan (**Figura R-12B y C**).

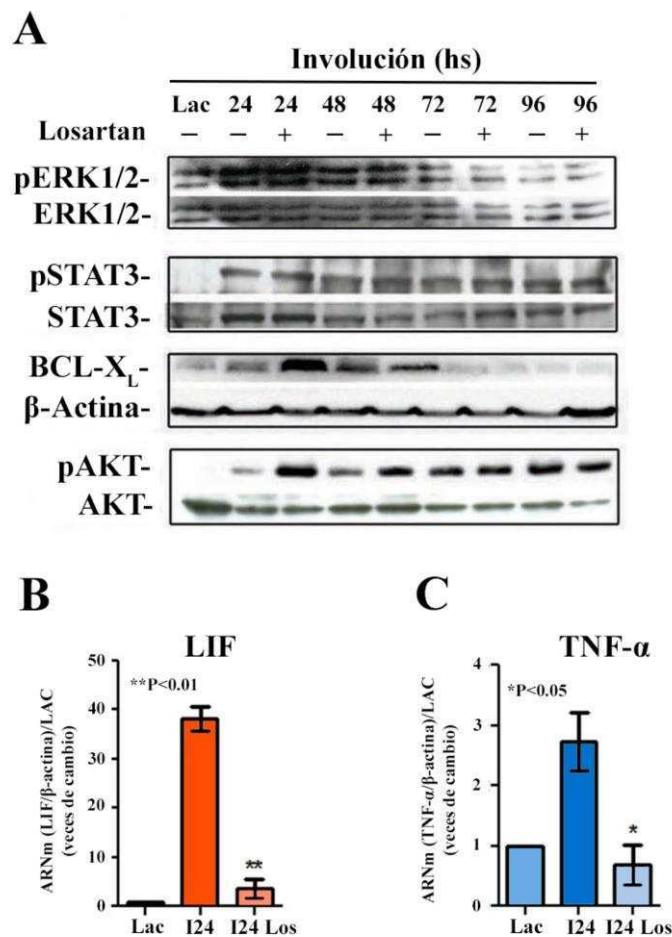


Figura R-12. Expresión y/o activación de factores pro- y anti-apoptóticos en glándulas mamarias de ratones tratados con losartan durante la involución. (A) Análisis por *Western Blot* de las formas fosforiladas y nativas de ERK1/2, AKT y STAT3, BCL-X_L y β -actina. Las proteínas fueron extraídas de glándulas mamarias de ratones tratados con losartan vs vehículo, a distintos tiempos del involución (24, 48, 72 y 96 hs). Se utilizaron muestras de glándulas en fase de lactancia como control negativo. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 realizados. **(B)** Análisis por *RT-qPCR* de los genes de expresión temprana LIF y TNF- α . El ARN fue extraído de

glándulas mamarias con 24 hs de involución, provenientes de hembras tratadas con losartan o vehículo. Los niveles de ARNm son expresados en unidades arbitrarias y fueron normalizadas a β -actina y relativizadas a lactancia. Las barras indican la media \pm SE de n = 3. [LIF ** $P < 0.01$; TNF- α * $P < 0.05$ losartan vs lactancia].

1.6. El bloqueo de AT1-R afecta el proceso de remodelado tisular durante la involución mamaria.

A partir de las 72 hs, comienza la segunda fase de la involución mamaria, la cual es irreversible e implica principalmente la ruptura de la MEC y el remodelado tisular. Dicho proceso, es generado principalmente por la actividad de las metaloproteasas de matriz, cuya función se encuentra bloqueada en la primera fase de la involución por la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) (Green and Lund, 2005). La actividad de dichas proteasas se encuentra altamente regulada a través de numerosos procesos, evitando así la proteólisis excesiva y el consecuente daño tisular (Walsh et al., 2012). Por otro lado, se ha reportado que AngII promueve la síntesis de MMPs (Rüster and Wolf, 2006), encontrándose niveles considerablemente mayores de MMP-9, en tumores que sobreexpresaban AT1-R (Oh et al., 2016). Por lo tanto, comenzamos analizando los componentes del estroma mamario durante la involución, en cortes histológicos de mamas provenientes de ratones tratados con losartan. Para ello, utilizamos la técnica colorimétrica *Tricrómico de Masson*, cuya ventaja reside en la posibilidad de visualizar, al mismo tiempo, fibras de colágeno, fibras reticulares y tejido conectivo. Al igual que para las inmunohistoquímicas, el análisis morfológico fue realizado con la ayuda y supervisión del Dr. Roberto Meiss de la Academia Nacional de Medicina. Como se muestra en la **Figura R-13**, la deposición de fibras de colágeno y reticulina alrededor de los alvéolos y estructuras ductales, fue menor en los cortes de mamas tratadas con losartan, comparado con las que recibieron sólo el vehículo. Dicha diferencia, se observó a las 48, 72 y 96 hs post-destete.

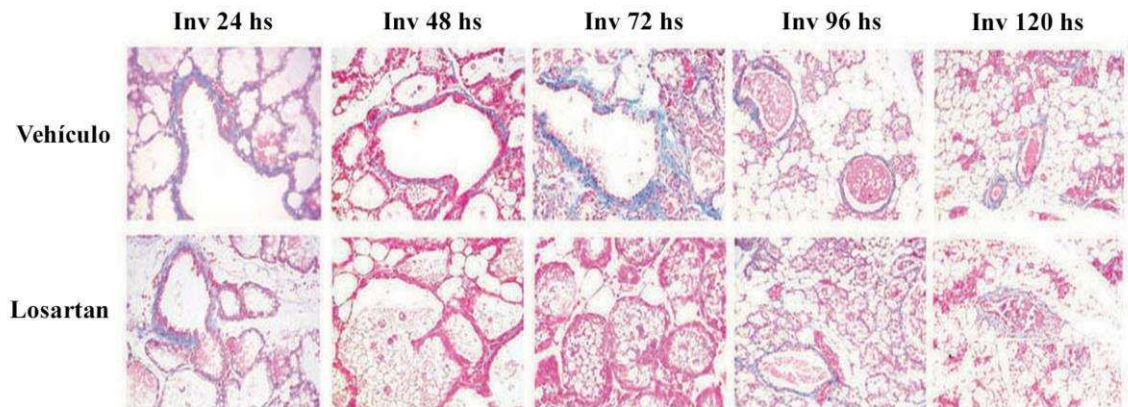
Tricrómico de Masson

Figura R-13. Losartan inhibe el depósito de fibras de colágeno y reticulina durante la involución. Tinción *Tricrómico de Masson* de cortes de mamas provenientes de ratones tratados con vehículo (panel de arriba) o Losartan (panel de abajo), a diferentes tiempos durante la involución (Aumento 250X). Los resultados corresponden a un experimento respresentativo ($n = 4$). Azul: colágeno y fibras de reticulina; rojo oscuro/púrpura: núcleos; rojo/rosa: citoplasma.

A continuación, analizamos la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, las cuales se destacan por su capacidad para degradar específicamente el colágeno tipo IV, uno de los componentes de mayor abundancia en la MEC (Gomes et al., 2012). En colaboración con el grupo de la Dra. Simian del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, realizamos zimografías en geles de poliacrilamida/SDS co-polimerizados con gelatina, en los cuales separamos extractos proteicos extraídos de mamas pre-tratadas con losartan o vehículo, en ambas fases de la involución (24, 48, 72, 96 y 120 hs). Luego de 24 hs de incubación, identificamos una inhibición significativa en la actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 en glándulas de ratones tratados con losartan vs vehículo, en la segunda fase de la involución mamaria (**Figura R-14**).

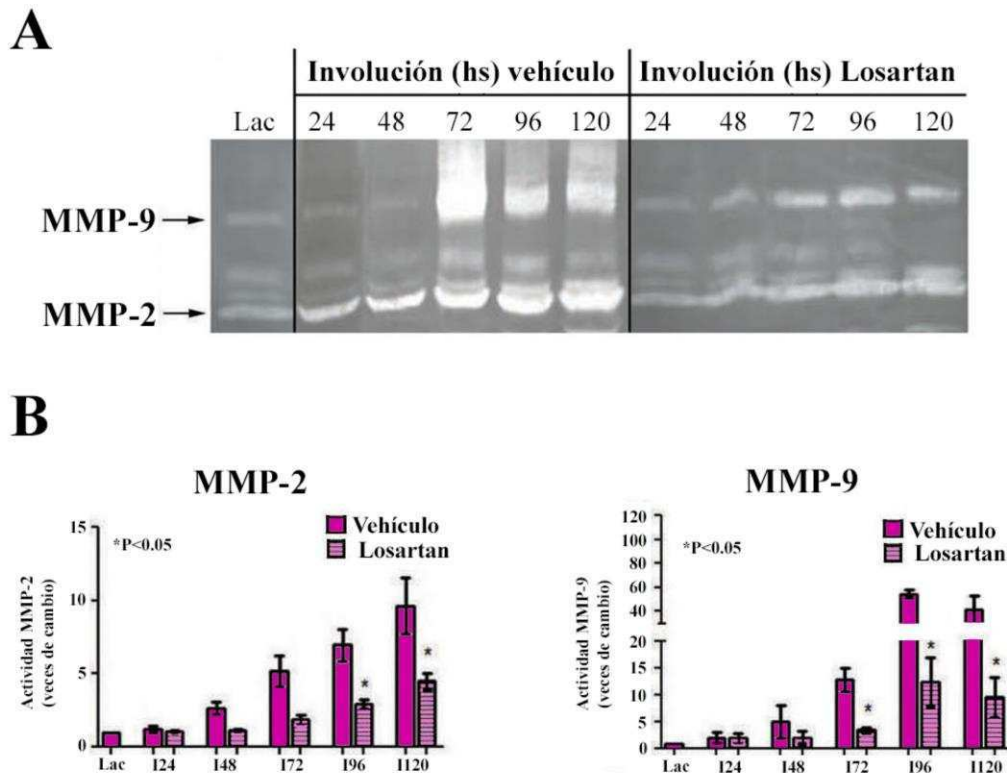


Figura R-14- Losartan inhibe la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 durante la involución. (A) Análisis por zimografía de la actividad de MMP-2 y MMP-9, a partir de extractos proteicos obtenidos de glándulas mamarias provenientes de ratones tratados con vehículo vs losartan a distintos tiempos. Se utilizaron muestras extraídas de mamas en fase de lactancia como control negativo. Los resultados muestran una imagen en negativo correspondiente a un zimograma de gelatina, representativa de los 3 experimentos realizados. (B) Análisis por densitometría de los zimogramas para MMP-2 y MMP-9. Se cuantificaron proteínas totales como control de carga, y cada uno de los tratamientos fue relativizado a lactancia. Los valores que se muestran en los gráficos de barra representan el promedio \pm SE de $n \geq 3$; [$* P < 0.05$ vs lactancia].

Por lo tanto, estos resultados sugieren que, a través de la interacción con su receptor AT1-R, la AngII generada de forma endógena induce la activación de MMPs y la deposición de colágeno, procesos fundamentales en la fase tardía de la involución mamaria.

1.7. Ratones deficientes en las isoformas AT1a y AT1b de AT1-R, presentan un retardo en el proceso de involución.

En roedores, a diferencia de humanos, el AT1-R se expresa a través de dos isoformas: AT1a y AT1b, las cuales son productos de genes expresados y regulados diferencialmente. No obstante, éstas son farmacológicamente indistinguibles (Clauser et al., 1996). Teniendo en cuenta dichas características, así como los resultados obtenidos del bloqueo farmacológico de AT1-R, decidimos utilizar otra

estrategia que nos permitiera evaluar la relevancia de ambas isoformas de AT1-R durante la involución mamaria. De esta forma, estudiamos glándulas mamarias extraídas de ratones deficientes en AT1a-R (AT1aKO), AT1b-R (AT1bKO) o ambas isoformas (DKO), tanto en fase de lactancia, como en involución tardía (72 y 96 hs post-destete). A modo de control, se utilizaron glándulas mamarias de ratones *wild-type* (*wt*) en cada uno de los estadíos. Considerando que los nacimientos provenían de hembras deficientes en AT1-R y machos *wt*, es importante destacar que la lactancia de las crías no se vio sustancialmente afectada, las cuales crecían y se alimentaban normalmente. La realización de dicho estudio, fue posible gracias a la colaboración establecida con el Dr. Thomas Walther de la Universidad de Leipzig, Alemania, quien gentilmente nos cedió los tejidos *KO* y mediante los cuales realizamos cortes histológicos que luego utilizamos para los distintos ensayos.

En primera instancia, analizamos la histoarquitectura de las glándulas mamarias en las diferentes condiciones experimentales mencionadas, a través de cortes histológicos teñidos con H&E. Con respecto a las las mamas lactantes, no observamos cambios evidentes en aquellas provenientes tanto de ratones deficientes para una como para ambas isoformas de AT1-R, con respecto a las extraídas de ratones *wt*. Sin embargo, la ausencia de AT1 provocó efectos dramáticos en la involución mamaria. Consistente con los resultados obtenidos mediante el bloqueo farmacológico de AT1-R con losartan, tanto los animales AT1aKO y AT1bKO como los *DKO*, mostraron un retardo significativo en involución. Esto significa que, ambas isoformas, cumplen un rol durante dicho proceso. Luego de las 72 hs post-destete, las glándulas *wt* presentaron escasos cúmulos de células epiteliales, con una intensa invasión de tejido adiposo (**Figura R-15A**). Por el contrario, observamos que, en ratones deficientes en AT1a-R, la mayor parte de las estructuras lóbulo-alveolares se encontraban abiertas y distendidas, muy poco colapsadas, y con un mínimo infiltrado adipositario. Por otro lado, al analizar la morfología de las mamas de ratones AT1bKO a las 72 hs, detectamos que, si bien presentaron cambios similares a los de las glándulas AT1aKO, éstos se manifestaban de forma más leve. Al evaluar las distintas condiciones a las 96 hs post-destete, las glándulas deficientes en AT1-R mostraron estructuras alveolares abiertas y conservadas, con un incremento en la relación células epiteliales/adipocitos, en comparación con las glándulas *wt*. En la **Figura R-15B**, se muestra el resultado de un *Tricrómico de Masson* realizado en cortes de glándulas mamarias deficientes en ambas isoformas *vs wt*, correspondientes a 72 hs de involución. Puede observarse que, la deposición de colágeno alrededor de las

estructuras ductales y alveolares de las mamas *DKO*, disminuye con respecto al control *wt*.

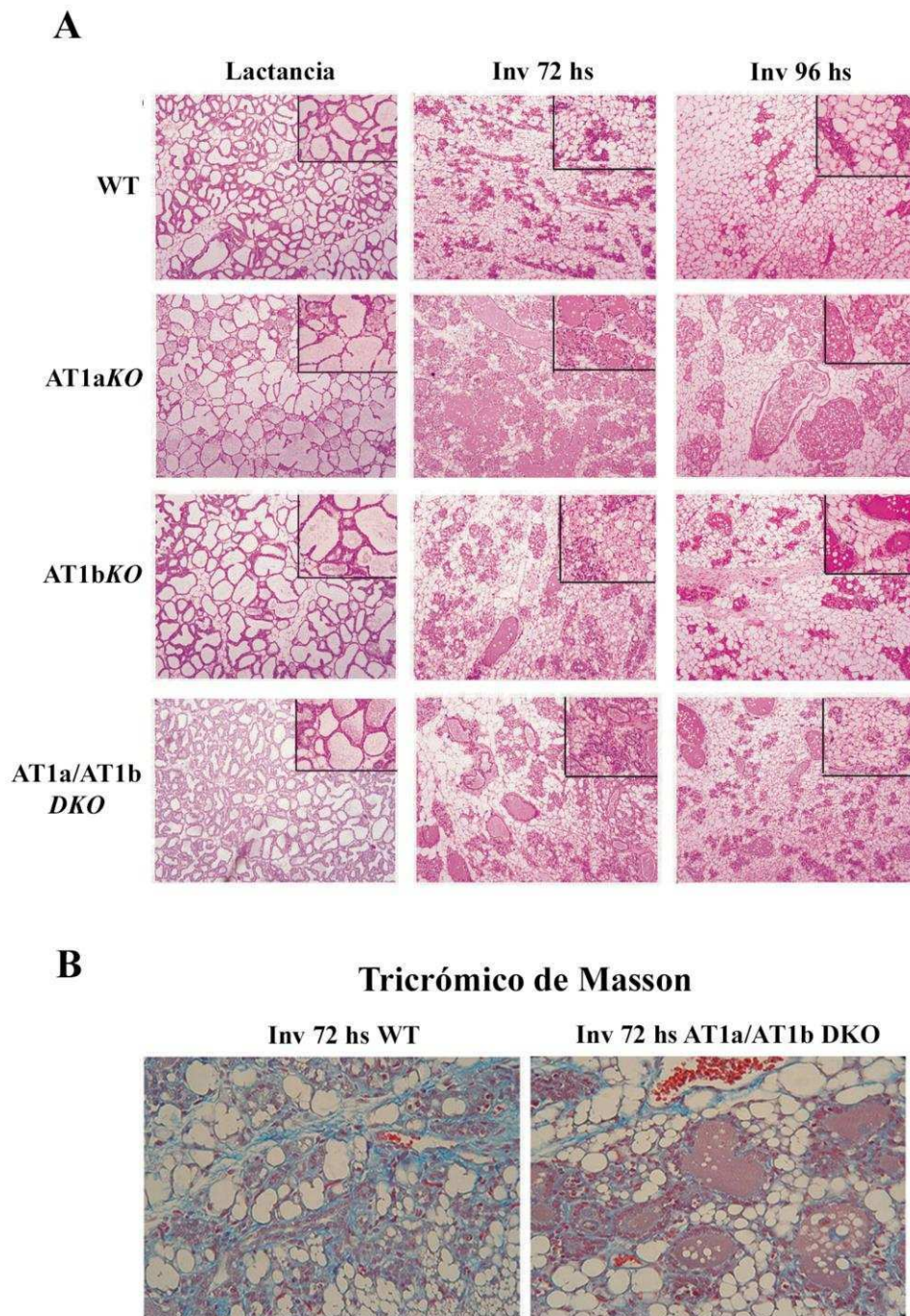


Figura R-15. Ratones deficientes en el receptor AT1-R presentan un retardo en el proceso de involución. (A) Tinción H&E de cortes de glándulas mamarias en fase de lactancia e involución tardía (72 y 96 hs), provenientes de ratones *WT* o deficientes en AT1a-R y/o AT1b-R (*AT1aKO*, *AT1bKO*, *AT1a/AT1b DKO*) (Aumento 100X, insertos 400X). **(B)** Tinción *Tricrómico de Masson* de cortes de glándulas mamarias 72 hs post-destete, correspondientes a ratones *WT* y *AT1a/AT1b DKO* (Aumento 400X). Azul: colágeno y fibras de reticulina; rojo oscuro/púrpura: núcleos; rojo/rosa: citoplasma. En ambos ensayos, los resultados corresponden a un experimento representativo de los 3 realizados.

En segunda instancia, estudiamos los niveles de apoptosis en mamas deficientes en ambas isoformas de AT1-R. Al igual que para los ensayos realizados en presencia de losartan, se utilizaron tanto la técnica de *TUNEL* como la detección de caspasa-3 clivada mediante inmunohistoquímica. Se analizaron cortes de mamas a las 72 hs post-destete, y se incluyeron nuevamente cortes de mamas *wt* a modo de control. Notablemente, mediante los ensayos de *TUNEL* observamos que, el retardo en involución presente en los animales *DKO*, se correlaciona con un nivel significativamente menor de células epiteliales apoptóticas [$6.3 \pm 0.95\%$ *wt* vs. $3.3 \pm 0.56\%$ *DKO*; $P < 0.05$] (**Figura R-16A y B**). De la misma forma, detectamos un porcentaje menor de células positivas para caspasa-3 clivada, en los cortes de mamas deficientes para AT1-R vs *wt* ($P < 0.001$) (**Figura R-16C y D**).

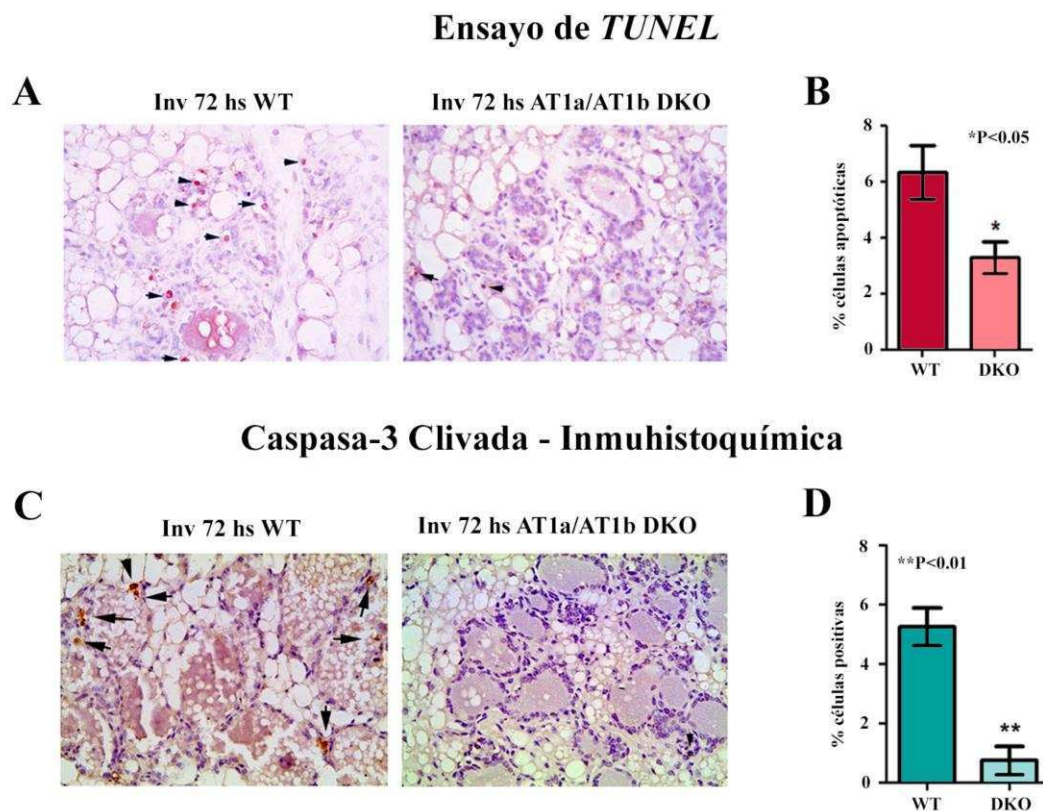


Figura R-16. Disminución de los niveles de apoptosis en ratones deficientes en el receptor AT1-R. **(A)** Análisis por *TUNEL* de cortes de glándulas mamarias a 72 hs de involución, provenientes de ratones *WT* y *AT1a/AT1b DKO*. Las flechas indican células apoptóticas (Aumento 400X). **(C)** Inmunohistoquímica (IHQ) de cortes histológicos marcados con un anticuerpo anti-caspasa-3 clivada, obtenidos de glándulas mamarias de ratones *WT* y *AT1a/AT1b DKO* en involución 72 hs. Las flechas indican células positivas para la marcación analizada. Los valores que se muestran en los gráficos de barras, representan el porcentaje promedio \pm SE de células teñidas positivamente para **(B)** *TUNEL* y **(C)** caspasa-3 clivada; $n = 3$ ratones/grupo; [$* P < 0.05$; $** P < 0.01$ vs *WT*].

Mediante el uso de dos estrategias experimentales diferentes, demostramos por primera vez que AngII, a través de su receptor AT1, cumple un rol crítico en el proceso de involución mamaria post-lactancia. Tanto el bloqueo farmacológico de AT1-R como el uso de ratones deficientes del AT1-R, mostraron un significativo retardo en la involución e inhibición de la apoptosis. Esto se vio acompañado, por un aumento de los niveles de factores de supervivencia AKT y BCL-X_L, así como por una disminución de la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 y de la expresión de los factores locales LIF y TNF- α .

Capítulo 2.

2. Ang-(1-7): un nuevo péptido que contrarresta los efectos pro-tumorales del eje ECA/AngII/AT1-R.

2.1. Análisis de la expresión de los receptores AT1-R y MAS-R en líneas celulares mamarias normales y tumorales.

En los últimos años, el eje ECA2/Ang-(1-7)/MAS-R se ha convertido en el foco de estudio del RAS contemporáneo, fundamentalmente por su capacidad de contrarrestar los principales efectos indeseables del eje ECA/AngII/AT1-R en diversos tejidos. La AngII, no sólo cumple un rol fisiológico en un determinado órgano o sistema, sino que además se asocia al desarrollo y progreso de diversas patologías, incluyendo el desarrollo de diversos tipos de tumores. No obstante, las publicaciones respecto a los efectos de Ang-(1-7) en tumores, continúan siendo escasas. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos interesó comenzar a estudiar si dicho péptido es capaz de contrarrestar los efectos de AngII en tumores mamarios.

En primer lugar, comenzamos analizando *in vitro* la expresión del receptor AT1-R de AngII y el receptor MAS-R de Ang-(1-7), en la línea celular epitelial mamaria NMuMG así como en la línea celular de cáncer de mama MDA MB-231. Como se destaca en la sección de *Materiales y Métodos*, la primera es una línea de origen murino, mientras que la segunda es de origen humano y se caracteriza por ser triple negativa (ER-, PR-,HER2-). Realizamos ensayos *RT-PCR* con *primers* específicos para ambos receptores (ver sección de *Materiales y Métodos*, **Tabla MyM-3**), a partir de cultivos celulares de NMuMG y MDA MB-231. Tal como se muestra en la **Figura R-17**, ambas líneas celulares expresan el AT1-R a nivel transcripcional. No obstante, se observa una menor expresión del MAS-R en las células tumorales.

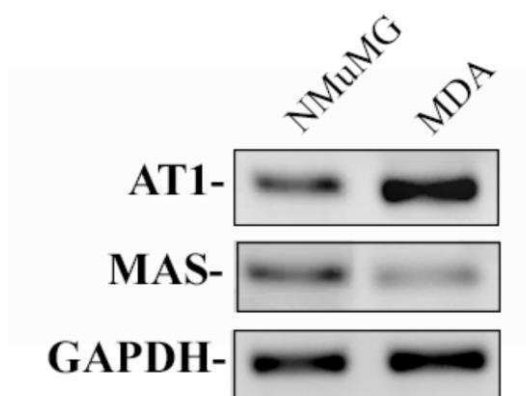


Figura R-17. Expresión de los receptores AT1-R y MAS-R en la línea celular epitelial mamaria NMuMG y en la línea celular mamaria tumoral MDA MB-231. Análisis de los niveles de ARNm de AT1-R y MAS-R, a través de ensayos de *RT-PCR*. Se utilizó el gen GAPDH como control de carga del experimento. Se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo, de un total de 3 realizados.

2.2. Efecto de Ang-(1-7) sobre la activación de factores de supervivencia y MAPKs, mediada por AngII.

El estudio de las diversas vías de señalización activadas por AngII/AT1-R, ha sido objeto de estudio de las últimas décadas, demostrando la capacidad de dicho octapéptido para desempeñar múltiples funciones no sólo a nivel endócrino, sino también parácrino, autócrino e intrácrino. De la misma manera, si bien aún muy reciente, se ha incorporado el análisis de las vías de transducción de señales mediadas por eje Ang-(1-7)/MAS-R (Gomes et al., 2012). Tal como se mencionó anteriormente, se han identificado efectos diferenciales entre ambos péptidos en diversos tejidos, vinculados principalmente al crecimiento, proliferación, supervivencia, inflamación y angiogénesis (Mehta and Griendling, 2007). Por lo tanto, decidimos analizar en primera instancia, que ocurría con la activación de la vía de PI3K/AKT y ERK1/2 en líneas celulares mamarias, dado que ambas vías de señalización se vinculan a dichos procesos (ver sección *Introducción: 2.3.3.2 Los receptores de AngII: AT1R y AT2R; 2.3.4.2 El receptor de Ang-(1-7): Mas-R*). Asimismo, tal como mencionamos en el capítulo anterior, AngII regula la activación de AKT y ERK1/2 en la glándula mamaria.

2.2.1. Análisis del perfil de activación de AKT en células epiteliales normales mamarias, en presencia de AngII y/o Ang-(1-7).

En primer lugar, analizamos los niveles de activación de AKT en la línea celular NMuMG, previamente estimulada con AngII o Ang-(1-7) 10^{-7} M a distintos tiempos (1, 5, 15, 30 y 60 min). Una vez finalizada la cinética, se cosecharon las células y se realizaron extractos proteicos, para luego someterlos a ensayos de *Western blot*, utilizando anticuerpos específicos para las formas fosforilada y total de AKT (ver sección de *Materiales y Métodos Tabla MyM-1*). Encontramos que ambos péptidos son capaces de inducir la fosforilación AKT en células epiteliales normales

mamarias. Sin embargo, el pico de activación provocado por Ang-(1-7) ocurre a los 15 min post-estímulo [1.92 veces de cambio vs control; $P < 0.01$], mientras que el de AngII ocurre al minuto de estimuladas las células [1.74 veces de cambio vs control; $P < 0.001$] (**Figura R-18A y B**). Con el objeto de determinar si Ang-(1-7) modula la cinética de activación desencadenada por AngII, decidimos estimular simultáneamente las células con ambos péptidos. Se utilizó la misma concentración de cada una de las angiotensinas, estimulando con Ang-(1-7) durante 1 min y agregando luego AngII durante el tiempo indicado. Tal como se muestra en la **Figura R-18C**, la estimulación conjunta con ambas angiotensinas, produjo un patrón de activación de AKT muy similar al desencadenado por Ang-(1-7), con un pico máximo a los 15 min post-tratamiento [1.76 veces de cambio vs control; $P < 0.001$].

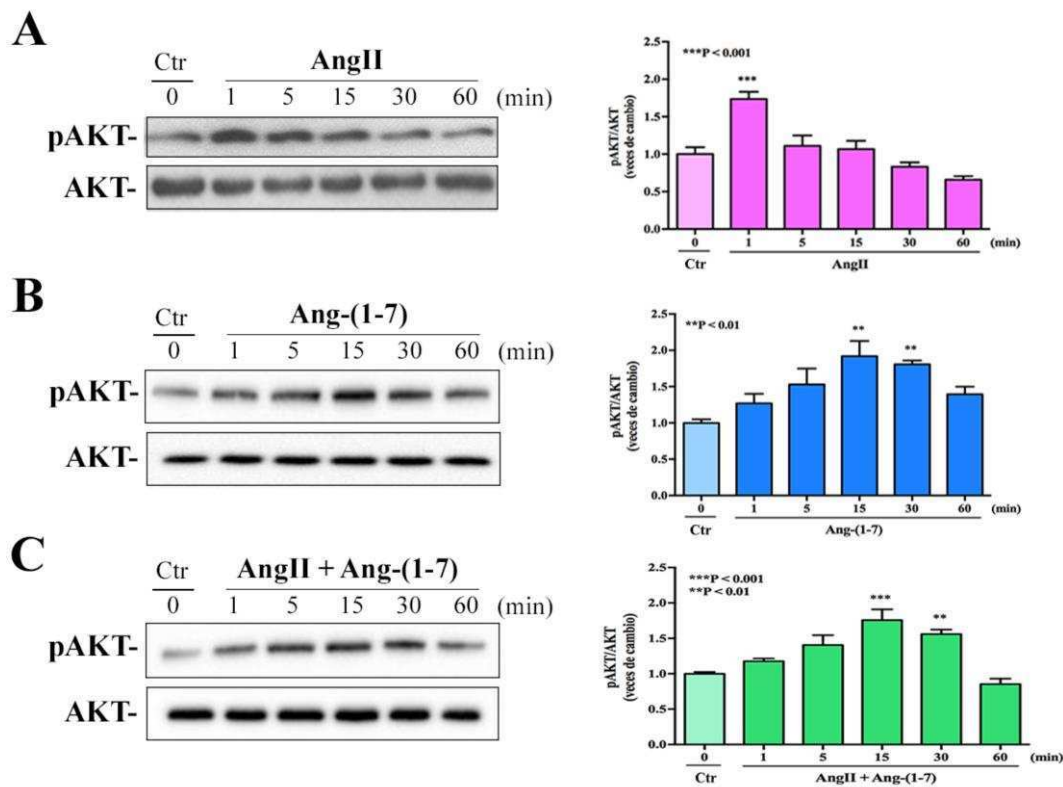


Figura R-18. Perfil de activación de AKT en células epiteliales mamarias normales, previamente estimuladas con AngII, Ang-(1-7) o ambas. Análisis por *Western blot* de las formas fosforilada y total de AKT, a partir de extractos proteicos de células NMuMG, tratadas con **(A)** AngII, **(B)** Ang-(1-7) o **(C)** AngII + Ang-(1-7), durante los tiempos indicados. A modo de control, se incluyeron células sin tratar (Ctr). Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría. Los niveles de pAKT se normalizaron a AKT total, y se relativizaron al tiempo 0 (Ctr). Las barras se expresan como la media \pm SE; $n = 3$ por duplicado; [$**P < 0.01$; $***P < 0.001$ vs Ctr].

A continuación, quisimos corroborar si la activación de AKT mediada por AngII y Ang-(1-7) en la línea celular en estudio, ocurre a través de AT1-R y MAS-R, respectivamente. Para ello, utilizamos antagonistas específicos de cada uno de los receptores, incluyendo el receptor AT2-R de AngII, los cuales se detallan a continuación:

- Irbesartan, para el bloqueo de AT1-R
- PD 123319, para el bloqueo de AT2-R
- A779 y D-Pro⁷, para el bloqueo de MAS-R

El diseño experimental, se detalla en el capítulo de *Materiales y Métodos* (sección 2.3. *Tratamientos*). El tiempo de estímulo con cada una de las angiotensinas, corresponde al pico máximo de fosforilación de AKT, detectado mediante las cinéticas a distintos tiempos (1 min para AngII y 15 min para Ang-(1-7)). A través del análisis por *Western blot*, comprobamos que la activación de AKT mediada por AngII ocurre principalmente vía AT1-R, detectándose una disminución significativa de la señal de pAKT en las muestras de células tratadas con irbesartan + AngII con respecto a las estimuladas con AngII (**Figura R-19A**). Corroboramos dicho resultado al demostrar que, las muestras de células tratadas con PD123319 + AngII, presentaban niveles de fosforilación de AKT similares a las tratadas con AngII únicamente.

Con respecto a Ang-(1-7), se observó una disminución significativa de los niveles de fosforilación de AKT, únicamente al bloquear el MAS-R con el antagonista A779 (**Figura R-19B**). Por el contrario, la señal de pAKT obtenida tanto en las muestras provenientes de células tratadas con D-Pro⁷, previo al estímulo con Ang-(1-7), no fue significativa con respecto a las tratadas sólo con Ang-(1-7). Si bien la mayor parte de las publicaciones indican que los efectos de Ang-(1-7) se deben a su interacción con el MAS-R, existen algunas evidencias que sugieren que dicho péptido también señala a través de la vía de AT2-R (Bosnyak et al., 2011; Gembardt et al., 2012). Sin embargo, dicha hipótesis resulta controversial, ya que por el contrario, una serie de estudios han demostrado que los efectos de Ang-(1-7) son independientes de AT2-R (Gembardt et al., 2012). Por lo tanto, incorporamos el tratamiento con PD123319, previo al estímulo con Ang-(1-7), para corroborar si dicho péptido señala a través del AT2-R, en la línea celular en estudio. No observamos cambios significativos en la activación de AKT, en células tratadas con PD123319 + Ang-(1-7), respecto a las tratadas sólo con Ang-(1-7) (**Figura R-19B**). Por otro lado, la especificidad de la interacción AngII/AT1-R ha sido ampliamente demostrada. No obstante, dado que la estructura aminoacídica de Ang-(1-7) difiere de la de AngII en tan solo un

aminoácido, analizamos la fosforilación de AKT mediada por Ang-(1-7), en células tratadas con irbesartan + Ang-(1-7). Nuevamente, no observamos diferencias respecto al tratamiento con Ang-(1-7) solamente (**Figura R-19C**). A través de estos resultados, descartamos la posibilidad de que Ang-(1-7) estuviera actuando a través de AT1-R o AT2-R, en la línea celular NMuMG.

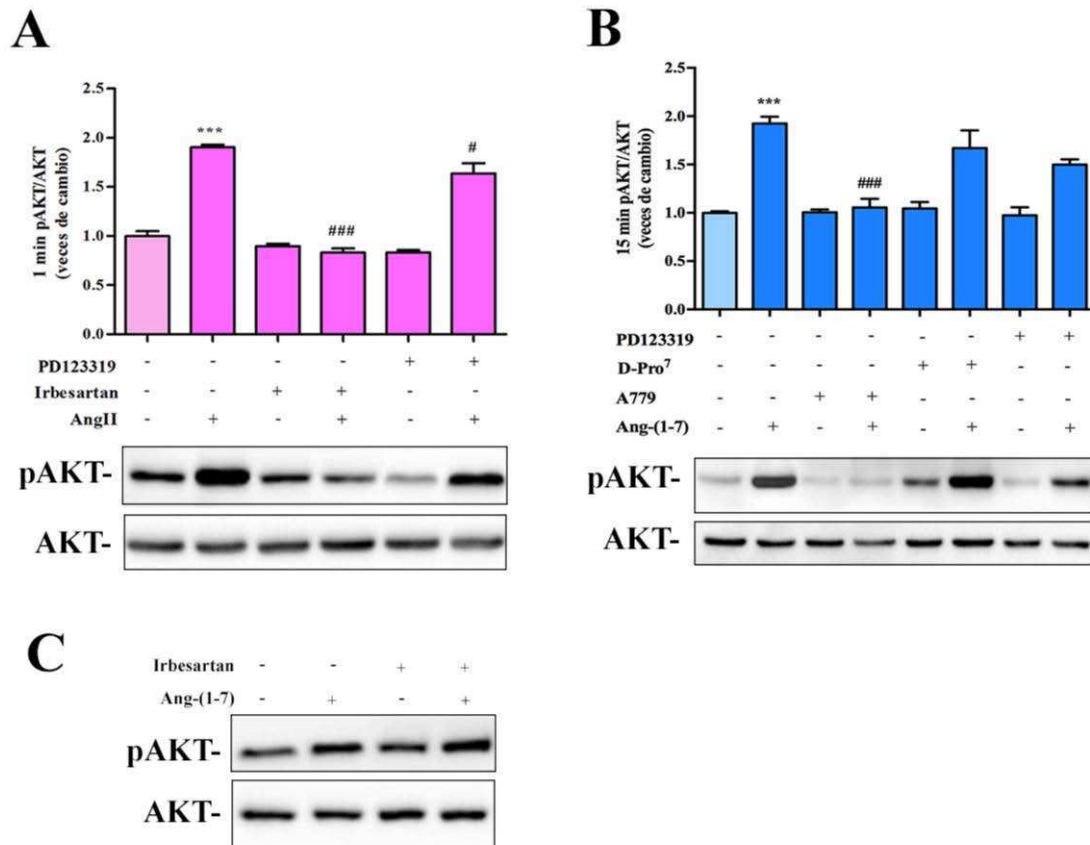


Figura R-19. AngII y Ang-(1-7) inducen la activación de AKT a través de los receptores AT1-R y MAS-R respectivamente, en células epiteliales mamarias normales. Análisis por *Western blot* de pAKT/AKT, a partir de extractos proteicos de células NMuMG, tratadas con **(A)** AngII y/o irbesartan; AngII y/o PD123319; con **(B)** Ang-(1-7) y/o A779; Ang-(1-7) y/o D-Pro⁷; Ang-(1-7) y/o PD123319; o con **(C)** Ang-(1-7) y/o Irbesartan. Las células se trataron durante 5 min con el antagonista correspondiente, para luego estimularlas con AngII o Ang-(1-7) durante 1 o 15 min respectivamente. Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría. Los niveles de pAKT se normalizaron a AKT total, y se relativizaron al control sin tratar. Las barras se expresan como la media \pm SE; n = 4 por duplicado; [*** P < 0.001 vs control; # P < 0.05 vs AngII; ### P < 0.001 vs AngII o Ang-(1-7)].

Cabe destacar que, tanto en los ensayos correspondientes a AngII como en los correspondientes a Ang-(1-7), se evaluó la fosforilación de AKT generada por los antagonistas *per se*. Como puede observarse, en todos los casos la señal obtenida

de células tratadas únicamente con los antagonistas, fue similar a la de los controles basales que no recibieron estímulo.

2.2.2. Análisis del perfil de activación de ERK1/2 en células epiteliales normales mamarias, en presencia de AngII y/o Ang-(1-7).

A continuación, estudiamos el patrón de activación de ERK1/2 en la línea celular NMuMG, utilizando el mismo modelo experimental que para los ensayos de AKT. En este caso, la estimulación a distintos tiempos (1, 5, 15, 30 y 60 min) con AngII o Ang-(1-7) arrojó un perfil de activación similar para ambos péptidos, con un pico máximo a los 5 min (**Figura R-20A y B**). Sin embargo, es interesante destacar que la señal correspondiente a Ang-(1-7), fue significativamente más débil que la obtenida para AngII [1.64 Ang-(1-7); 2.28 AngII veces de cambio vs control; $P < 0.01$]. Luego, analizamos los niveles de fosforilación de ERK1/2, al tratar células con ambas angiotensinas. Encontramos que, en presencia de Ang-(1-7), el pico de pERK1/2 desencadenado por AngII a los 5 min post-estímulo, se redujo a niveles similares a los de las muestras tratadas sólo con Ang-(1-7) (**Figura R-20C**).

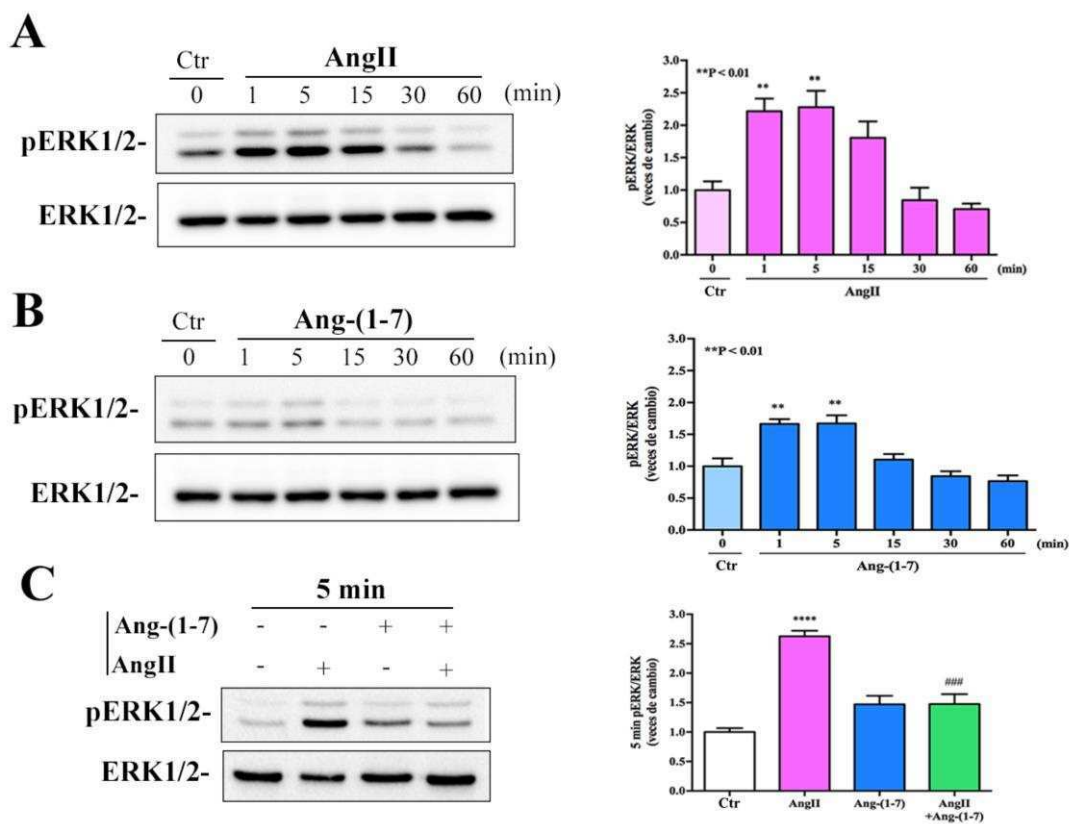


Figura R-20. Perfil de activación de ERK1/2 en células epiteliales mamarias normales, previamente estimuladas con AngII, Ang-(1-7) o ambas. Análisis por *Western blot* de las formas

fosforilada y nativa de ERK1/2, a partir de extractos proteicos de células tratadas con **(A)** AngII, **(B)** Ang-(1-7) o **(C)** AngII + Ang-(1-7), durante los tiempos indicados. Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría. Los niveles de pERK1/2 se normalizaron a ERK1/2 total, y se relativizaron al tiempo 0 (control). Las barras se expresan como la media \pm SE; n =3 por duplicado; [$**P < 0.01$; $***P < 0.001$ vs control; $###P < 0.001$ vs AngII].

Evaluamos a continuación, los receptores de AngII y Ang-(1-7) involucrados en la activación de ERK1/2, a través del bloqueo farmacológico de los mismos. Nuevamente, utilizamos irbesartan para el bloqueo de AT1-R, PD123319 para el bloqueo de AT2-R, y A779 y D-Pro⁷ para el bloqueo de MAS-R. Tal como se muestra en la **Figura R-21**, se produjo una disminución significativa en los niveles de fosforilación de ERK1/2, únicamente en muestras de células pre-tratadas con irbesartan, respecto a las tratadas con AngII solamente. Dicho resultado, señala al receptor AT1-R como el principal involucrado. Por otro lado, el bloqueo farmacológico del receptor MAS-R de Ang-(1-7) con A779 inhibió significativamente los efectos de Ang-(1-7) sobre la activación de ERK1/2, mientras que D-Pro⁷ afectó parcialmente la activación de dicha MAPK. Esto indica nuevamente, que la señalización de Ang-(1-7) involucra principalmente al receptor MAS-R. Por último, descartamos una vez más la posibilidad de que Ang-(1-7) estuviera gatillando la fosforilación de ERK1/2 a través de los receptores AT2-R y AT1-R (**Figura R-21B y C**).

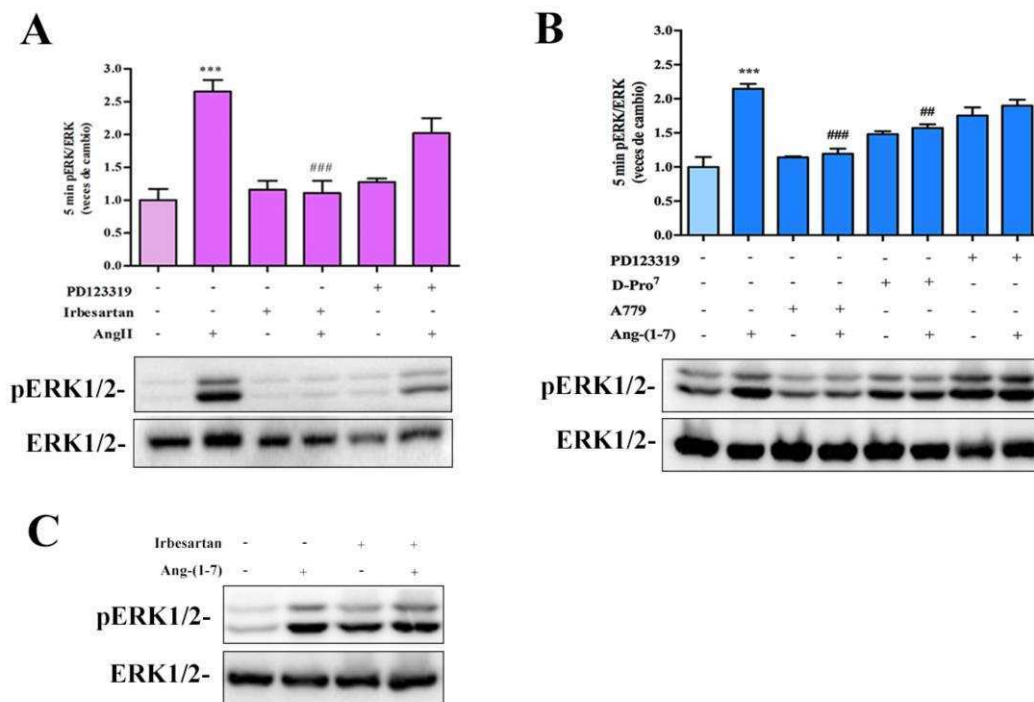


Figura R-21. AngII y Ang-(1-7) inducen la activación de ERK1/2 a través de los receptores AT1-R y MAS-R respectivamente, en células epiteliales mamarias. Análisis por Western blot de

las formas fosforilada y nativa de ERK1/2, a partir de extractos proteicos de células NMuMG, tratadas con **(A)** AngII y/o irbesartan; AngII y/o PD123319; con **(B)** Ang-(1-7) y/o A779; Ang-(1-7) y/o D-Pro⁷; Ang-(1-7) y/o PD123319; o con **(C)** Ang-(1-7) y/o Irbesartan. Las células se trataron durante 5 min con el antagonista correspondiente, para luego estimularlas con AngII o Ang-(1-7) durante 5 min. Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría. Los niveles de pERK1/2 se normalizaron a ERK total, y se relativizaron al control sin tratar. Las barras se expresan como la media \pm SE; n = 4 por duplicado; [***P < 0.001 vs control; ##P < 0.01 vs Ang-(1-7); ###P < 0.001 vs AngII o Ang-(1-7)].

Los resultados obtenidos, indican que AngII y Ang-(1-7), a través de sus receptores AT1-R y MAS-R respectivamente, inducen la activación del factor de supervivencia AKT y la MAPK ERK1/2, en células epiteliales mamarias no tumorales. Sin embargo, en presencia de Ang-(1-7), se inhiben los efectos desencadenados por AngII.

2.3 Efectos de AngII y Ang-(1-7) sobre la Transición Epitelio Mesenquimal (TEM), en la línea celular mamaria NMuMG.

La Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) ha sido reconocida como un mecanismo celular, tanto en el desarrollo normal como tumoral de la célula (Micalizzi et al., 2010; Nieto, 2013; Thiery et al., 2009; Yilmaz and Christofori, 2009). La evidencia acumulada en los últimos años, destaca principalmente la importancia de los eventos asociados a la TEM en la transformación maligna, favoreciendo el desarrollo de propiedades invasivas y metastáticas en las células cancerosas incipientes. Esto significa, que la TEM no sólo favorece la progresión tumoral, sino también el inicio y desarrollo de tumores primarios (Puisieux et al., 2014).

2.3.1. Análisis de la expresión de marcadores de TEM en presencia de AngII y/o Ang-(1-7).

Considerando la probada participación de la TEM en la metástasis tumoral, nuestro siguiente objetivo fue determinar si Ang-(1-7) es capaz de contrarrestar los efectos de AngII en dicho proceso. Para ello, trabajamos con la línea celular NMuMG, frecuentemente utilizada para ensayos de TEM (Cheung et al., 2015; Haynes et al., 2011; Lotz-Jenne et al., 2016; Richards et al., 2015), por su capacidad para diferenciarse a células de características mesenquimales, en presencia de TGF- β (Miettinen et al., 1994). Particularmente, trabajamos con el subclon E9,

representativo de la línea parental en cuanto a su morfología y expresión de E-cadherina (Maeda et al., 2005) (ver sección *Materiales y Métodos: 2.1.2 Línea celular NMuMG E9*).

Analizamos la morfología, localización y expresión del marcador epitelial E-cadherina y el marcador mesenquimal FN, en células NMuMG tratadas durante 4 días con AngII y/o Ang-(1-7), a una concentración final de 10^{-7} M. Para ello, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia (IF) en colaboración con la Dra. Natalia Rubinstein (IFIByNE), utilizando anticuerpos específicos (ver sección de *Materiales y Métodos Tabla MyM-5*). Como control negativo del experimento, se utilizaron células tratadas únicamente con el vehículo y, como control positivo, células tratadas con TGF- β cada 48 hs (para mayor detalle, ver sección *Materiales y Métodos: 2.3. Tratamientos*). Observamos una marcada disminución de la expresión de E-cadh así como un aumento en los niveles de FN, únicamente en las células tratadas con AngII. Por otro lado, los niveles de E-cadh y FN no se alteraron en las células tratadas sólo con Ang-(1-7) respecto a las células sin tratar. Sorpresivamente, el tratamiento concomitante con ambos péptidos reveló altos niveles de expresión para E-cadh, mientras que la expresión de FN disminuyó respecto a la observada en las células que recibieron sólo AngII. Asimismo, detectamos la acumulación de dicha proteína principalmente en el citoplasma celular (**Figura R-22**).

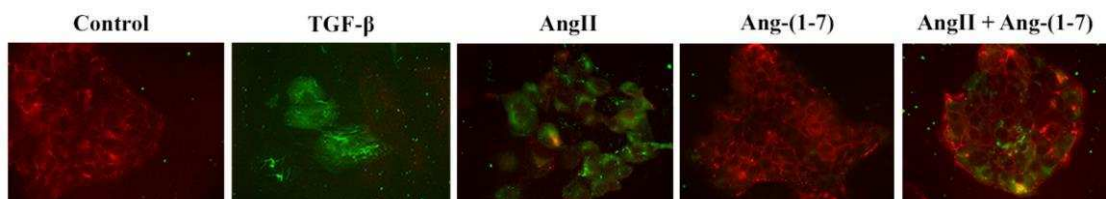


Figura R-23. Inmunolocalización de marcadores de TEM, en la línea celular NMuMG, previamente tratada con AngII y/o Ang-(1-7). Análisis por inmunofluorescencia (IF) de la expresión de E-cadh y FN, en células NMuMG. Las células fueron tratadas con AngII, Ang-(1-7) o ambas durante 4 días, con estímulos cada 24 hs. Se utilizaron células sin tratar (Ctr) como control negativo, y células tratadas con TGF- β 4 ng/ml como control positivo del experimento. Las células fijadas, se incubaron con un anticuerpo primario anti-E-cadh o anti-FN, para luego incubarlas con un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa 488 (FN: verde) o 568 (E-cadh: rojo). Los cortes se analizaron por microscopía de fluorescencia (Aumento 400X). Se muestra un experimento representativo de los 2 realizados.

Considerando los resultados obtenidos a nivel proteico, y dado que la TEM es un proceso transcripcional en el que la regulación génica tanto de marcadores epiteliales como mesenquimales es fundamental, estudiamos la expresión de ARNm de diversos marcadores de ambas estirpes. A diferencia del protocolo

correspondiente a los ensayos de IF, éste tuvo una duración de 3 días. Cumplido dicho tiempo de estímulo, las células se cosecharon para luego extraer ARN, y someter el ADNc correspondiente a *RT-qPCRs*, en las cuales se midió la expresión de E-cadherina, FN, N-cadherina y α -SMA, utilizando *primers* específicos para cada uno de ellos (ver sección de *Materiales y Métodos* **Tabla MyM-4**). Demostramos que el tratamiento con AngII durante 3 días, disminuye significativamente los niveles de expresión del marcador epitelial E-cadherina [0.52 veces de cambio *vs* control; $P < 0.001$], incrementando por el contrario, la expresión de los marcadores mesenquimales FN, N-cadherina y α -SMA [2.49 FN, 1.86 N-cadh, 2.0 α -SMA veces de cambio *vs* control; $P < 0.001$] (**Figura R-23**). Por otro lado, Ang-(1-7) no induce cambios notables en ninguno de los marcadores analizados, en comparación con el control sin tratar. Sin embargo, sorpresivamente encontramos que Ang-(1-7) anula total o parcialmente los efectos provocados por AngII, en células que recibieron el tratamiento conjunto con ambos péptidos [$P < 0.001$ AngII + Ang-(1-7) *vs* AngII]. Los niveles de expresión de E-cadherina y FN, se mantuvieron inalterados respecto al control sin tratar, mientras que la expresión de N-cadherina y α -SMA aumentó levemente en comparación con el mismo.

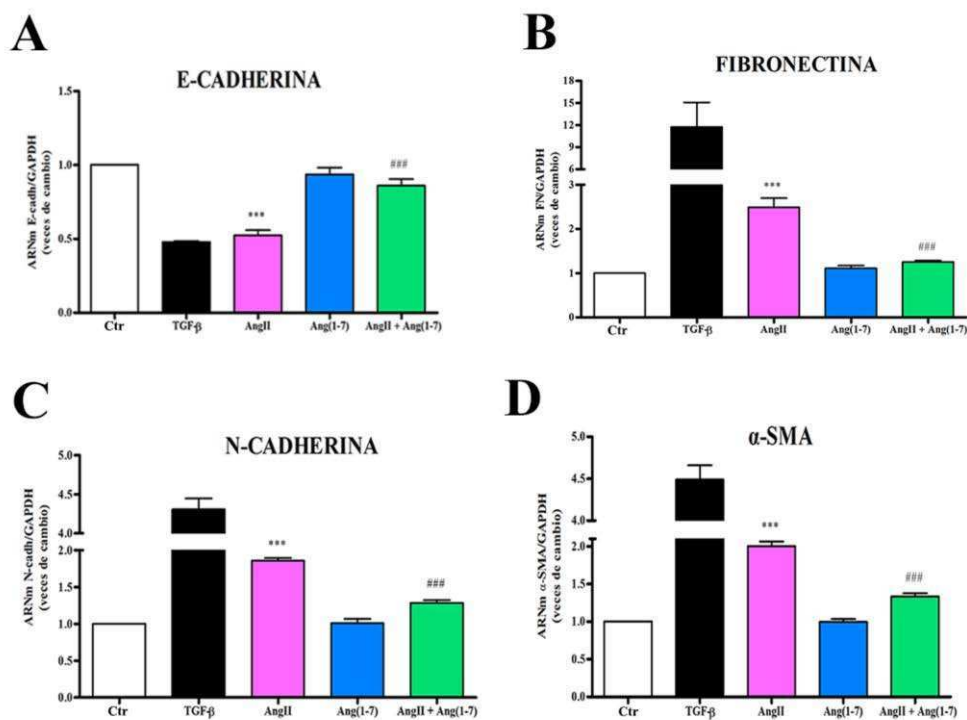


Figura R-23. Expresión de marcadores de TEM en la línea celular NMuMG, en presencia de AngII y/o Ang-(1-7). Las células fueron tratadas con AngII, Ang-(1-7) o ambas durante 3 días, con estímulos cada 24 hs. Se utilizaron células sin tratar (Ctr) como control negativo, y células tratadas con TGF- β 4 ng/ml como control positivo del experimento. Las células se cosecharon, se extrajeron

ARN de cada uno de los tratamientos y se cuantificó la expresión de ARNm de **(A)** E-cadherina; **(B)** Fibronectina; **(C)** N-cadherina; **(D)** α -SMA, mediante *RT-qPCRs*. Los niveles de ARNm se expresaron como unidades arbitrarias, los cuales fueron normalizados a GAPDH y relativizados al control sin tratar (Ctr). Las barras indican la media \pm SE; n = 4; [*** $P < 0.001$ vs Ctr; ### $P < 0.001$ vs AngII].

2.3.2. AngII induce la TEM, a través de la vía de activación de AKT.

El estudio de la TEM en diversos tipos celulares durante los últimos años, ha demostrado que dicho proceso es inducido por múltiples vías de señalización vinculadas a la oncogénesis. Entre ellas, la vía de PI3K/AKT es de particular interés (Grille et al., 2003; Larue and Bellacosa, 2005). Asimismo, diversas vías de señalización activadas durante la TEM, convergen en la vía de AKT.

Con estos datos, y habiendo demostrado anteriormente que AngII promueve la fosforilación de AKT en la línea celular NMuMG, nos interesó investigar si la inducción de la TEM por AngII, ocurre a través de la vía de activación de dicha quinasa. En este caso, las células fueron pre-tratadas con el inhibidor de AKT: A6730, para luego ser estimuladas con AngII. A continuación, evaluamos los niveles de expresión de los diferentes marcadores de TEM, mediante ensayos de *RT-qPCR*. Tal como se muestra en la **Figura R-24A**, los niveles de E-cadherina se recuperan significativamente en presencia del inhibidor de AKT, con valores muy cercanos al control sin tratar. Por otro lado, los niveles de FN disminuyen de forma significativa en células pre-tratadas con A6730, con respecto a las células que recibieron AngII únicamente (**Figura R-24B**). Asimismo, los niveles de expresión de N-cadherina y α -SMA, se restablecieron significativamente, si bien es en forma parcial (**Figura R-24C y D**).

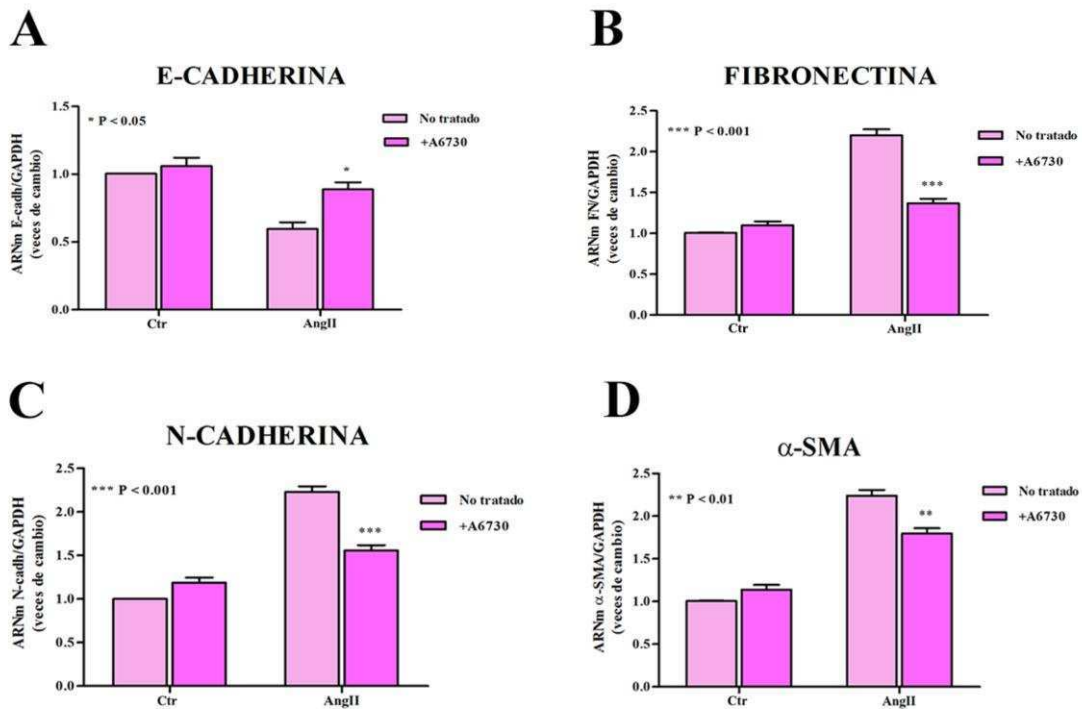


Figura R-24. AngII induce la TEM, a través de la vía de activación de AKT, en la línea celular NMuMG. Análisis de la expresión de ARNm de **(A)** E-cadherina; **(B)** Fibronectina; **(C)** N-cadherina; **(D)** α -SMA, mediante *RT-qPCRs*, en células tratadas durante 72 hs con AngII o AngII + A6730. Las células se incubaron durante 1 hora con A6730, previo al estímulo con AngII. Se utilizaron células sin tratar (Ctr) como control negativo, y células tratadas únicamente con el inhibidor (veh + A6730), para descartar cualquier efecto secundario. Los niveles de ARNm se expresaron como unidades arbitrarias, los cuales fueron normalizados a GAPDH y relativizados a AngII. Las barras indican la media \pm SE; n = 3; [* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs AngII].

AngII induce la TEM de células epiteliales mamarias, a través de la activación de AKT. Por otro lado, Ang-(1-7) inhibe significativamente los efectos desencadenados por AngII en dicho proceso.

2.4. Ang-(1-7) inhibe los efectos pro-angiogénicos y pro-invasivos mediados por AngII.

La angiogénesis sostenida, así como la migración, la invasión tisular y la metástasis, son algunas de las principales capacidades funcionales asociadas a la transformación maligna, en los cuales el eje AngII/AT1-R ha demostrado cumplir un rol clave. Particularmente en la glándula mamaria, se ha demostrado que la sobreexpresión de AT1-R en células de cáncer de mama, promueve el crecimiento,

migración e invasión celular *in vitro*, y el crecimiento tumoral *in vivo* (Rhodes et al., 2009).

Considerando las evidencias preexistentes, nos propusimos investigar si Ang-(1-7) era capaz de contrarrestar los efectos pro-angiogénicos y pro-invasivos de AngII en líneas celulares de cáncer de mama, centrándonos principalmente en los fenómenos de migración, invasión y niveles de expresión de factores vinculados a la angiogénesis e invasión tumoral.

2.4.1 Ang-(1-7) contrarresta los efectos de AngII sobre la migración e invasión celular, en células tumorales mamarias.

En primera instancia, evaluamos los efectos de Ang-(1-7) vs AngII sobre la migración de líneas celulares tumorales mamarias de carácter invasivo. Para ello, utilizamos dos metodologías: la migración por “cicatrización de herida” (*Wound Healing Assay*), y la migración a través de cámaras *transwell* (*Transwell Migration Assay*). En el primer caso, evaluamos la tasa de migración de las líneas celulares metastásicas MDA MB-231 y LM3, para lo cual calculamos el área cubierta de la herida luego de 16 hs de incubación con AngII y/o Ang-(1-7) 10^{-7} M, en medio libre de SFB. Tal como había sido reportado previamente por Rodrigues-Ferreira et al (Rodrigues-Ferreira et al., 2012), AngII incrementó significativamente la capacidad migratoria de la línea celular MDA MB-231 respecto al control sin tratar [1.9 veces de cambio vs control; $P < 0.001$] (**Figura R-25A**). La misma tendencia obtuvimos en células LM3 tratadas únicamente con AngII [2.13 veces de cambio vs (control); $P < 0.001$] (**Figura R-25B**). Por el contrario, si bien Ang-(1-7) no produjo cambios significativos en las células tumorales analizadas, ésta fue capaz de revertir significativamente el efecto de AngII sobre la migración de ambas líneas [$P < 0.001$ AngII+Ang-(1-7) vs AngII]. A modo de control, evaluamos la proliferación celular mediante el ensayo de MTS, luego de incubar las células con los diferentes estímulos durante 24 hs. Tal como se muestra en la **Figura R-25C**, no se detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. De esta forma, se excluye la posibilidad de que los efectos provocados por Ang-(1-7) vs AngII en la migración de células tumorales (cerramiento de la herida), se vean afectados por un incremento en la tasa de proliferación de las mismas.

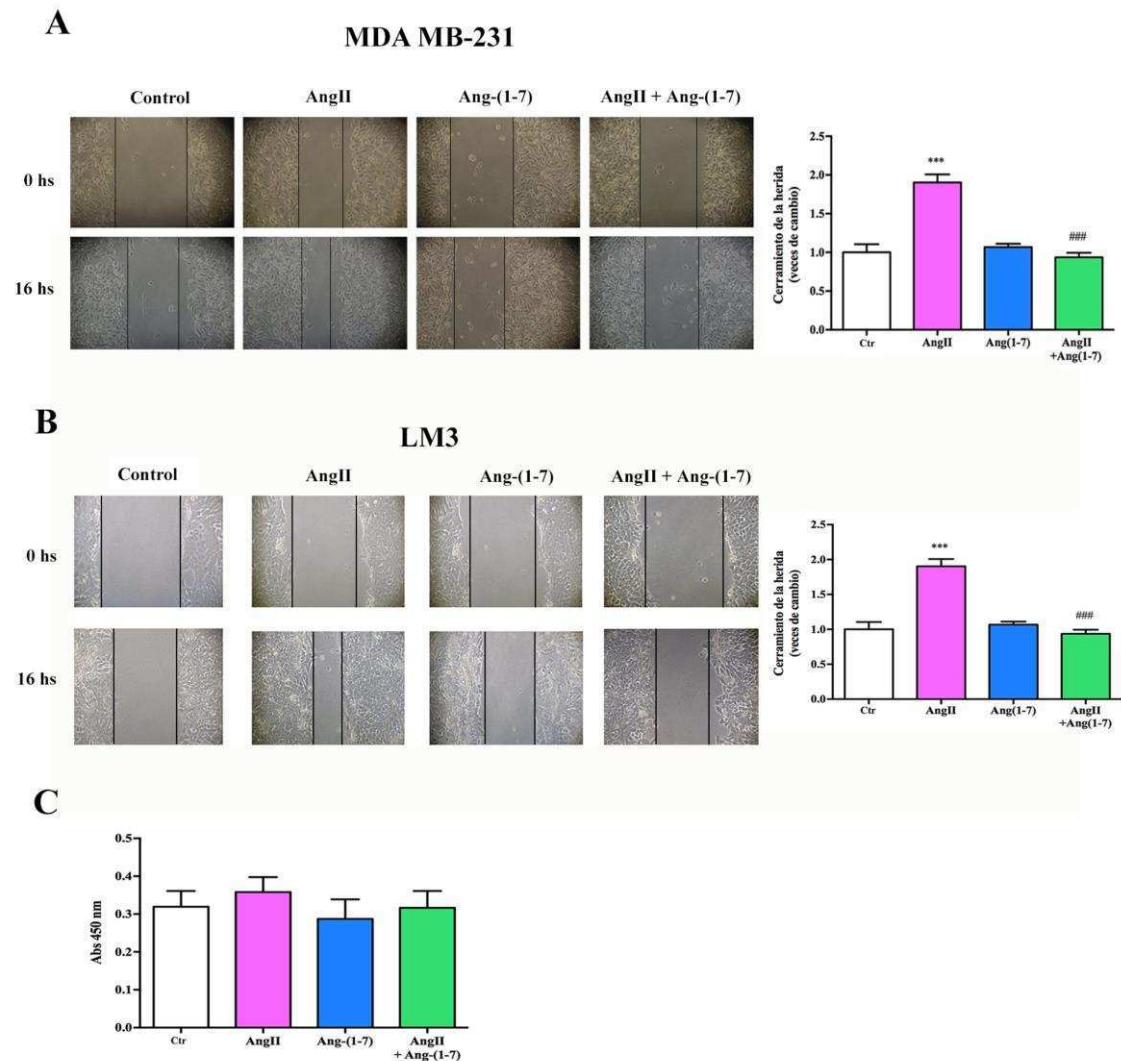


Figura R-25. Ensayo de migración por cicatrización de herida (*Wound Healing Assay*) en líneas celulares tumorales mamarias, en presencia de AngII y/o Ang-(1-7). Se generaron “heridas” sobre células **(A)** MDA MB-231 y **(B)** LM3, estimuladas durante 16 hs con AngII y/o Ang-(1-7) en medio libre de SFB. Se utilizaron células sin tratar (Ctr) como control negativo del experimento. Las heridas se registraron por microscopía de contraste de fases, a tiempo 0 (panel de arriba) y 16 hs post-estímulo (panel de abajo) (Aumento 100X). Se capturaron imágenes de cada tiempo, y se cuantificó la diferencia entre el área no cubierta a las 0 hs y la medida a las 16 hs (cerramiento de la herida). Las barras muestran la media \pm SE de 4 experimentos independientes realizados por triplicado y expresado como las veces de cambio del cerramiento de la herida a las 16 hs con respecto al Ctr. [*** $P < 0.001$ vs Ctr; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ vs AngII]. **(C)** Ensayo de MTS en células MDA MB-231, tratadas durante 24 hs con AngII y/o Ang-(1-7). Se incluyeron células sin tratar (Ctr) como control negativo. Las barras muestran la media \pm SE de 3 experimentos independientes realizados por sextuplicado.

Con el propósito de corroborar y reforzar los resultados obtenidos, llevamos a cabo ensayos de migración a través de cámaras *transwell*. En este caso, la capacidad migratoria de las células se evaluó mediante el número de células que

atravesaron la membrana del policarbonato del *transwell* (para mayor detalle ver sección *Materiales y Métodos: 5.1.2. Ensayos de Migración a través de Cámaras Transwell*). Las células se incubaron con AngII y/o Ang-(1-7) durante 20 hs, en medio libre de suero. Como puede observarse en la **Figura R-26A**, nuevamente demostramos la habilidad de AngII para inducir de manera significativa la migración de células tumorales mamarias [271 cél/campo AngII vs 131 cél/campo control; $P < 0.001$]. Por el contrario, si bien Ang-(1-7) *per se* no induce migración, al estimular las células con ambos péptidos se anula la capacidad migratoria de AngII [164 cél/campo AngII+Ang-(1-7) vs 271 cél/campo AngII; $P < 0.001$].

En segunda instancia, nos interesó estudiar los efectos de Ang-(1-7) sobre la invasión de células tumorales MDA MB-231. A diferencia del ensayo anterior, las membranas de los *transwells* fueron pre-tratadas con *matrigel*, para simular las propiedades de la MEC. Luego de 24 hs de incubación, detectamos un mayor número de células capaces de atravesar el *matrigel*, en aquellas tratadas únicamente con AngII [141 cél/campo AngII vs 59 cél/campo control; $P < 0.001$]. Sin embargo, la tasa de invasión disminuyó significativamente en las células tratadas con ambas angiotensinas [82 cél/campo (AngII+Ang-(1-7) vs 141 cél/campo AngII; $P < 0.05$], demostrando una vez más la capacidad de Ang-(1-7) para revertir los efectos pro-tumorales de AngII (**Figura R-26B**).

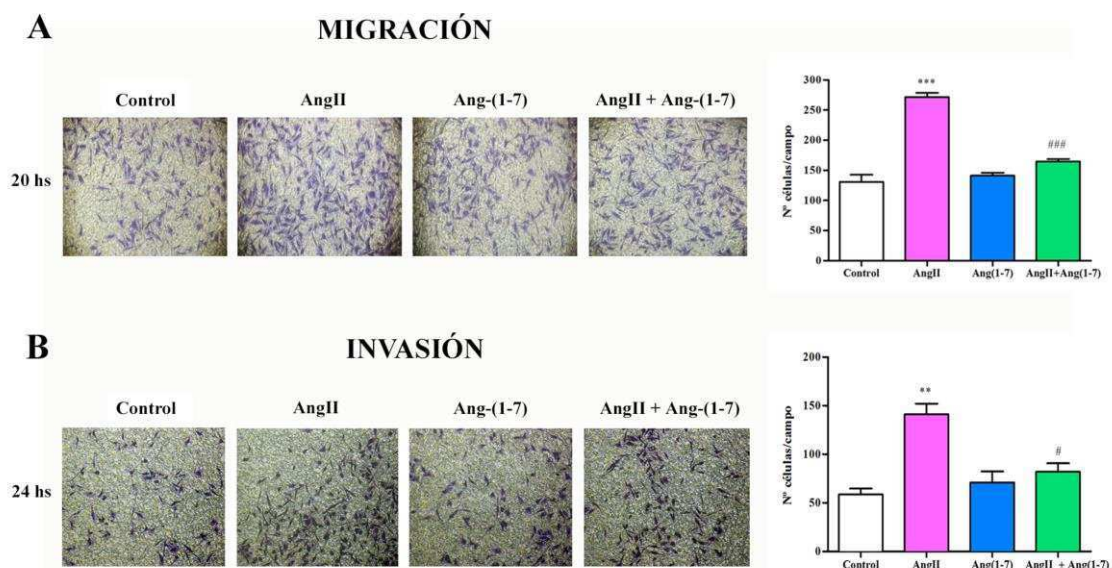


Fig R-26. Ang-(1-7) contrarresta los efectos de AngII sobre la migración e invasión celular, en células tumorales mamarias. (A) Ensayo de migración a través de cámaras *transwell*, previamente tratadas con un *coating* de colágeno. Se sembraron células MDA MB-231 en la cámara superior del *transwell*, y se las estimuló con AngII y/o Ang-(1-7) durante 20 hs. **(B)** Ensayo de invasión a través de cámaras *transwell*, previamente tratadas con un *coating* de *matrigel*. Se sembraron células MDA MB-231 en la cámara superior del *transwell*, y se las estimuló con AngII y/o

Ang-(1-7) durante 24 hs. En ambos ensayos, se utilizaron células sin tratar como control negativo (Control), y células en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB como control positivo. Se tomaron imágenes de 5-10 campos al azar por *transwell*, y se cuantificó el número de células por campo (Aumento 100X). Las barras muestran la media \pm SE de 4 experimentos independientes realizados por duplicado; [$**P < 0.01$; $***P < 0.001$ vs Ctr; $\#P < 0.05$; $###P < 0.001$ vs AngII].

2.4.2 Análisis de la expresión y/o activación de VEGF y MMP-9 en células tumorales mamarias.

La regulación de la angiogénesis tumoral, es probablemente uno de los principales mecanismos a través del cual, el eje AngII/AT1-R ejerce efectos pro-tumorales. Se ha reportado tanto *in vitro* como *in vivo*, la existencia de una correlación entre la expresión de AngII y VEGF en diversos tipos de tumores, incluyendo tumores de mama (Chen et al., 2013; Jethon et al., 2012). En este mismo contexto, se ha documentado además la participación de AngII en la regulación de la expresión y actividad de MMP-9 y MMP-2 (Roomi et al., 2009).

Nos propusimos dilucidar entonces, si Ang-(1-7) incide en los procesos mencionados. De acuerdo a los datos recién expuestos, estudiamos los niveles de expresión de ARNm de VEGF y MMP-9, en células MDA MB-231 tratadas durante 24 hs con AngII y/o Ang-(1-7) 10^{-7} M. Para ello, realizamos ensayos de *RT-qPCR* con oligonucleótidos específicos (ver sección de *Materiales y Métodos* **Tabla MyM-4**), a través de los cuales detectamos un incremento significativo en la expresión de VEGF y MMP-9, en células tratadas sólo con AngII [2.39 VEGF; 2.32 MMP-9, veces de cambio vs control; $P < 0.001$]. Por el contrario, resulta interesante que, a pesar de que Ang-(1-7) *per se* no produjo ningún efecto respecto al control, ésta fue capaz de inhibir significativamente los niveles de expresión de VEGF y MMP-9 inducidos por AngII, a valores similares al control (**Figura R-27A y B**).

A continuación, estudiamos los efectos de Ang-(1-7) y AngII sobre la actividad de MMP-9. Nuevamente, se trataron células MDA MB-231 con AngII y/o Ang-(1-7) 10^{-7} M y, luego de 24 hs, se recolectaron los medios condicionados correspondientes. A través de zimografías, corroboramos que AngII incrementa la actividad de MMP-9 en células tumorales mamarias [2.49 veces de cambio vs control; $P < 0.001$]. Asimismo, demostramos que la estimulación conjunta con ambas angiotensinas disminuye significativamente la actividad de dicha metaloproteasa, reforzando los resultados del análisis transcripcional anterior (**Figura R-27C**).

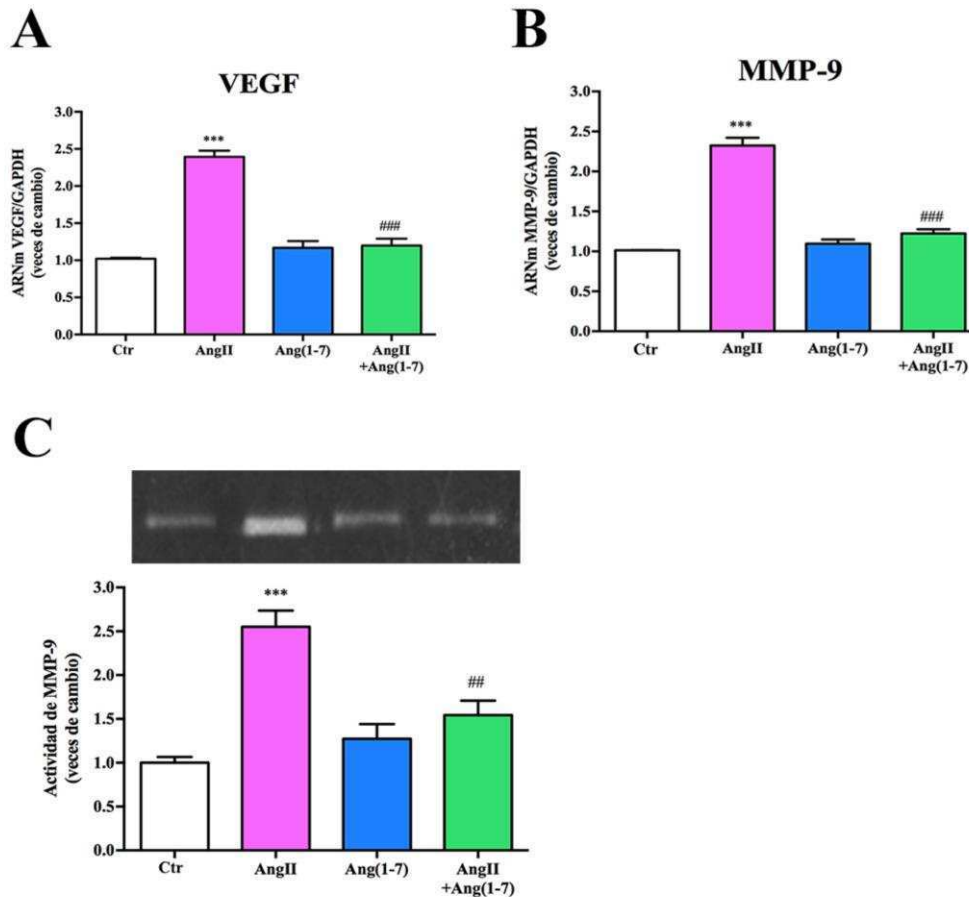


Fig R-27. Análisis de la expresión y/o activación de VEGF y MMP-9 en células tumorales mamarias, en presencia de AngII y/o Ang-(1-7). Cuantificación de los niveles de ARNm de **(A)** VEGF y **(B)** MMP-9 mediante ensayos de *RT-qPCR*, en células MDA MB-231 estimuladas durante 24 hs con AngII y/o Ang-(1-7). Se utilizaron células sin tratar (Ctr) como control negativo. Los niveles de ARNm se expresaron como unidades arbitrarias, los cuales fueron normalizados a GAPDH y relativizados al control sin tratar (Ctr). Las barras indican la media \pm SE; $n = 3$. **(C)** Análisis de la actividad de MMP-9 mediante zimografías en geles de gelatina, en medios condicionados provenientes de células MDA MB-231, tratadas durante 24 hs con AngII y/o Ang-(1-7). Se utilizaron medios condicionados de células sin tratar (Ctr) como control negativo. Los zimogramas se analizaron por densitometría, y se cuantificaron proteínas totales como control de carga. Cada uno de los tratamientos fue normalizado al control sin tratar (Ctr). Los valores de las barras expresan la media \pm SE; $n = 3$ por duplicado. [*** $P < 0.001$ vs Ctr; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ vs AngII].

Los resultados obtenidos, sugieren que Ang-(1-7) inhibe los efectos pro-angiogénicos y pro-metastásicos mediados por AngII, en células tumorales mamarias de carácter metastásico. Se demostró por primera vez, que Ang-(1-7) disminuye significativamente la capacidad migratoria e invasiva de dichas células, así como los niveles de expresión y/o actividad de marcadores vinculados al desarrollo y la angiogénesis tumoral.

DISCUSIÓN

Capítulo 1.

1. Rol de la AngII y de los componentes del RAS en la involución mamaria post-lactancia.

La involución mamaria post-lactancia, es un proceso complejo de múltiples pasos, que en varios aspectos se asemeja al de cicatrización de herida o leve inflamación, ambos con factores asociados a la progresión, metástasis y supervivencia en cáncer de mama (Baxter et al., 2006). De hecho, el estudio de mecanismos moleculares y celulares involucrados en la involución mamaria, se ha incrementado en los últimos años. Si bien la involución mamaria es un excelente modelo para el análisis de la regulación de la apoptosis y el remodelado tisular, su auge se debe principalmente a su similitud con la oncogénesis mamaria. Paradójicamente, diversos factores inductores de la apoptosis y del remodelado tisular durante la involución, se encuentran además constitutivamente activados en cáncer de mama. Entre ellos, cabe mencionar a citoquinas pro-inflamatorias como LIF, TNF α , IL-6, OSM, y otros factores relevantes como NF- κ B, metaloproteasas de matriz (MMPs) y el factor de transcripción STAT3 (Watson, 2006).

Por otro lado, durante las últimas décadas se ha demostrado que los componentes del **Sistema Renina Angiotensina (RAS)** no sólo se expresan a nivel sistémico, sino que también lo hacen a nivel local en la mayor parte de los tejidos estudiados (Silver et al., 2004). En consecuencia, se han descrito nuevas funciones tejido específicas del RAS (Roks and Henning, 2003), introduciéndose así el concepto del RAS tisular o local, y redefiniendo a dicho sistema no sólo por sus propiedades endócrinas, sino también parácrinas, autócrinas e incluso intrácrinas.

A partir de estos antecedentes, en una primera hipótesis planteamos la existencia de una asociación funcional entre el RAS y la involución mamaria post-lactancia. De esta forma, en la primera parte de este trabajo, nos enfocamos en caracterizar la expresión del RAS local y el rol de dicho sistema en la fisiología de la glándula mamaria normal, particularmente durante el proceso de involución.

1.1 Análisis de la expresión de los componentes del RAS en la glándula mamaria normal, durante la involución.

Los trabajos publicados hasta el momento, únicamente postulaban la existencia de un RAS tisular en la glándula mamaria. Éstos demostraban que ambos receptores del AngII se expresaban en el tejido mamario humano, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Herr et al., 2008; Tahmasebi et al., 2006). Sin embargo, la mayor parte de las publicaciones se focalizaban en investigar el rol del RAS en el contexto tumoral. Por lo tanto, aún no existían evidencias contundentes que demostraran que el RAS local cumple un papel fundamental en la fisiología normal de la glándula mamaria.

Si bien la expresión del RAS *in vitro* ya había sido demostrada en diversas líneas celulares, aún no se había reportado en líneas celulares epiteliales mamarias. Nosotros mostramos la expresión de los receptores AT1-R y AT2-R en la línea celular murina HC11, tanto a nivel transcripcional como proteico (**Figura R-1**).

Nos interesó esclarecer si AngII podría ejercer algún rol durante la involución mamaria post-lactancia. De acuerdo a algunos trabajos publicados, AngII es capaz de activar, en distintos tipos de células y tejidos, vías de transducción de señales críticas para la inducción y progreso de la involución, tales como la vía de STAT3, ERK1/2 y NF- κ B, así como la síntesis de citoquinas proinflamatorias tales como TNF α , IL-6 y LIF (Eguchi et al., 2001; Mehta and Griendling, 2007; Zhang et al., 2005). A partir de dichos antecedentes, evaluamos la modulación de la expresión de los componentes del RAS durante las fases de lactancia e involución, en glándulas mamarias de ratón. Encontramos cinéticas de expresión específicas para AT1-R, AT2-R, ECA y AGT durante la fase de involución. Durante la lactancia, la expresión de los componentes del RAS es relativamente baja. Por otra parte, es interesante destacar que, la expresión de AT1-R, AT2-R y AGT, aumenta durante la fase tardía de la involución mamaria, mientras que el pico de ECA se registra a las 6 hs post-destete (**Figura R-2**). Por otro lado, la liberación de factores locales ha sido propuesta como uno de los estímulos primarios responsables de desencadenar la apoptosis del epitelio mamario durante la involución (Chapman et al., 1999). Asimismo, se sugiere que el estiramiento mecánico de las células epiteliales en respuesta a la acumulación de leche en los ductos y alvéolos, es uno de los potenciales mediadores de dicho estímulo (Quaglino et al., 2009). Se sabe que citoquinas de la familia de IL-6, aumentan su expresión luego del estiramiento mecánico en diferentes tipos celulares (Pan et al., 1999; Zampetaki et al., 2005).

Por otro lado, ha sido ampliamente demostrado que el estiramiento mecánico es capaz de desencadenar la expresión de todos los transcritos del RAS, tanto *in vitro* como *in vivo* (Kodama et al., 1998; Sadoshima et al., 1993). Curiosamente, el bloqueo del receptor AT1-R inhibe la activación de vías intracelulares, tales como la vía de JAK/STAT (Pan et al., 1999), activadas en respuesta a la inducción del RAS local por estiramiento mecánico en diferentes tejidos (Kojima et al., 1994; Yamazaki et al., 1995). Asimismo, se sugiere que el AT1-R podría ser activado por estiramiento mecánico, en ausencia de su ligando AngII (Zou et al., 2004). De acuerdo a estos antecedentes, y en función de los resultados obtenidos, proponemos que el estiramiento mecánico inducido por la falta de succión, podría estar disparando la expresión de ECA durante la fase temprana de la involución mamaria, incrementando la producción de AngII local. De esta forma, actuando a nivel parácrino/autócrino junto con otros factores locales, dicho péptido podría activar la vía de JAK/STAT3, induciendo apoptosis. No obstante, aún es necesario realizar nuevos experimentos que permitan discriminar si el estiramiento mecánico, desencadena directamente la activación de AT1-R y/o induce la expresión del RAS en células epiteliales mamarias.

Con respecto al receptor AT2-R, si bien se expresa en altos niveles a lo largo de la vida fetal, su expresión en el tejido adulto en condiciones normales es baja. Sin embargo, se ha reportado que su expresión aumenta significativamente en procesos inflamatorios y en tejidos lesionados, sugiriendo una participación en la génesis del fenómeno inflamatorio y/o en su resolución (Ruiz-Ortega et al., 2003). Dichos antecedentes, podrían explicar el aumento de los niveles de expresión de AT2-R durante la involución tardía, reportado en el presente trabajo, ya que dicha fase se caracteriza principalmente por el intenso remodelado tisular de la glándula mamaria. Sin embargo, aún queda por dilucidar cuáles son los estímulos que disparan la expresión de AT1-R, AT2-R y AGT en la fase tardía de la involución.

1.2 AngII induce la activación de STAT3 y ERK1/2, así como la apoptosis del epitelio mamario durante la involución.

El factor de transcripción STAT3 se encuentra involucrado en la regulación de genes asociados al proceso de involución, y a la activación de la muerte celular programada del epitelio mamario (Baxter et al., 2007). La importancia de la rápida activación de STAT3 para el inicio de la apoptosis durante la involución temprana, ha sido ampliamente reportada. Estudios realizados en glándulas mamarias provenientes de ratones *KO* condicionales para STAT3, mostraron una supresión

de los niveles de apoptosis epitelial y, consecuentemente, un retardo significativo en la involución mamaria (Chapman et al., 1999; Kritikou et al., 2003). Asimismo, tal como se mencionó anteriormente, una serie de factores locales promueven el comienzo de la apoptosis y, por ende, estimulan la fosforilación de STAT3 y su translocación al núcleo durante la involución. Nuestro grupo de investigación, entre otros, reportaron que a pocas horas luego del destete, la expresión de la citoquina LIF, y en menor medida de IL-6, juega un papel relevante en la activación de STAT3 en la glándula mamaria (Kritikou et al., 2003; Levy et al., 2010; Zhao et al., 2002). Por otro lado, la lactancia resulta una fase ideal para el estudio de cascadas de transducción de señales pro-apoptóticas en la glándula mamaria, dado que STAT3 permanece en estado inactivo durante dicha fase y, por ende, los niveles de apoptosis de células epiteliales son muy bajos. Nosotros demostramos por primera vez, que AngII es un nuevo factor capaz de incrementar los niveles de fosforilación de STAT3 y su translocación al núcleo, en glándulas mamarias de ratones en fase de lactancia tratados con AngII (**Figura R-6 A y B; R-7**). Asimismo, observamos que el co-tratamiento con el inhibidor de AT1-R irbesartan, bloquea la fosforilación de STAT3, demostrando que la activación de dicho factor, ocurre a través del receptor AT1-R.

Por otro lado, Zhao et al. en el año 2002 encontraron altos niveles de activación de ERK1/2 a las 24 horas de involución mamaria, con respecto a lo observado en hembras en estadio de lactancia (Zhao et al., 2002). Existen varios reportes en los cuales AngII induce activación de ERK1/2 (Eguchi et al., 2001; de Gasparo et al., 2000; Greco et al., 2003). Asimismo, la Lic. Natalia Fernández reportó en su tesis de licenciatura, que AngII es capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2 en la línea celular epitelial mamaria HC11, en la cual ya se había demostrado la activación de dicha MAPK mediado por LIF (Quaglino et al., 2007). En este trabajo, demostramos que AngII induce la fosforilación de ERK1/2, en mamas de hembras lactantes tratadas con AngII. Al igual que para STAT3, dicha activación es mediada por AT1-R (**Figura R-8**).

Por último, habiendo demostrado la capacidad de AngII para inducir la activación de STAT3 y ERK1/2, analizamos la participación de dicho péptido en el desencadenamiento de la apoptosis del epitelio mamario. Efectivamente, AngII incrementó el porcentaje de células apoptóticas en glándulas mamarias lactantes.

A través de los resultados obtenidos, postulamos a AngII como un factor local putativo, capaz de desencadenar la apoptosis del epitelio mamario, principalmente a través de la activación de STAT3 en la glándula mamaria normal.

1.3 El receptor AT1-R cumple un rol clave en el desarrollo de la involución mamaria.

De acuerdo a la bibliografía, el receptor AT1-R se presenta como un receptor ubicuo en el tejido adulto, siendo el principal mediador de los efectos de AngII (De Gasparo, 2002). Dado que encontramos que los efectos de AngII ocurren principalmente a través del AT1-R, y que éste aumenta notablemente su expresión durante la involución, estudiamos el rol de la AngII endógena y de AT1-R, en la fase de involución mamaria *in vivo*.

Utilizando el bloqueo farmacológico de AT1-R como primer estrategia, corroboramos el hallazgo de la Dra. Nahmod, quien observó un retardo en la fase de involución, en glándulas mamarias de ratones previamente tratados con losartan. Principalmente, dicho retardo se manifestó en términos de proporción de infiltrado adipositario y alvéolos colapsados (**Figura R-10**). Este resultado, nos llevó a investigar los efectos del AT1-R sobre los eventos asociados a la involución mamaria.

En primera instancia, identificamos una disminución significativa de los niveles de apoptosis epitelial durante la involución (**Figura R-11 y R-12**), al interrumpir la señalización de AT1-R. Dicho hallazgo, asociado al pico en la expresión de ECA a las 6 hs post-destete (**Figura R-3**), y a la activación de STAT3 resultante de la administración de AngII durante la lactancia (**Figura R-6**), nos condujo a la hipótesis de que AngII podría generarse en la fase temprana de la involución, gatillando la fosforilación de STAT3 e induciendo apoptosis. No obstante, determinamos que el retardo inducido por el bloqueo de AT1-R era independiente del estado de activación de los factores pro-apoptóticos STAT3 y ERK1/2 (**Figura R-13A**). Aun así, no podemos excluir la posibilidad de que AngII, a través de AT1-R y en colaboración con otros factores locales, induzca la activación de dichos factores durante la involución. Particularmente, el hecho de que los niveles de pSTAT3 permanezcan intactos, a pesar del bloqueo de AT1-R durante la involución, podría indicarnos que diversos factores locales tales como LIF e IL-6 y posiblemente AngII, presentan funciones redundantes respecto a la activación de STAT3. De esta forma, se compensaría el efecto inhibitorio del bloqueo de AT1-R sobre la activación de dicho factor.

Por otro lado, el aumento de señales anti-apoptóticas y de supervivencia en glándulas mamarias post-lactantes tratadas con losartan, es un mecanismo molecular crítico subyacente al retardo en involución previamente observado. Asimismo, la vía de PI3K/AKT, así como los miembros de la familia de BCL-2, han

sido identificados como reguladores clave de la apoptosis/supervivencia celular en la glándula mamaria (Baxter et al., 2006; Schwertfeger et al., 2001; Walton et al., 2001). La activación de AKT, ha sido reportada como una señal crítica de supervivencia durante la involución (Schwertfeger et al., 2001); mientras que la delección del gen de BCL-X_L, acelera dicho proceso (Walton et al., 2001). Nuestros resultados sugieren que AngII, a través de AT1-R, induce apoptosis en glándulas mamarias en involución, posiblemente a través de la regulación hacia abajo de factores de supervivencia como AKT y BCL-X_L (**Figura R-13A**).

Otro de los mecanismos críticos subyacentes revelado en el presente trabajo, es la inhibición de la expresión de factores locales, tales como LIF y TNF- α , como consecuencia del bloqueo de AT1-R con losartan durante la involución. Inicialmente, el retiro de las crías así como la estasis de la leche, inducen factores locales que conducen a la apoptosis epitelial. Se ha reportado, que la expresión de LIF y TNF- α son inducidas sólo unas pocas horas luego de la interrupción de la lactancia (Levy et al., 2010; Schere-Levy et al., 2003). La disminución significativa de los niveles de expresión de ambos factores en la fase temprana de la involución (**Figura 13B y C**), inducida por el bloqueo de AT1-R, también contribuyen, al menos en parte, al retardo observado en la involución.

A partir de las 72 hs post-lactancia, comienza la segunda fase de la involución mamaria. El bloqueo de AT1-R durante esta etapa, provocó un retardo en el patrón de remodelado de la MEC, caracterizado por una mayor proporción de estructuras lóbulo-alveolares y una menor proporción de deposición de colágeno e invasión adipositaria (**Figura R-10 y R-14**). Dicho efecto puede explicarse en parte, a partir de la inhibición significativa de la actividad de MMP-2 y MMP-9, demostrando además, la relevancia de la señalización de AT1-R en la activación de metaloproteasas durante la involución tardía (**Figura R-15**). Se ha reportado, que la actividad de estas MMPs, así como la de la MMP-3 y MMP-11, aumenta en la segunda fase de la involución (Watson and Kreuzaler, 2011). Éstas contribuyen a la pérdida de células epiteliales y el remodelado del árbol de conductos mamarios, desestabilizando las interacciones críticas epitelio-MEC. Las estructuras alveolares comienzan a colapsar, y los adipocitos empiezan a repoblar la glándula (Lund et al., 1996). No obstante, poco se sabe acerca de las vías de señalización que median la activación de MMPs, la deposición de colágeno y la regeneración del tejido adiposo, durante la involución mamaria. Se ha demostrado, que AngII participa no sólo en la respuesta inflamatoria, sino también en procesos de remodelado tisular, induciendo la expresión y actividad de MMP en distintos tipos celulares (Browatzki et al., 2005; Guo et al., 2008; Luchtefeld et al., 2005). Asimismo, se ha

reportado que antagonistas del receptor AT1-R disminuyen la deposición de colágeno durante el remodelado tisular, en diferentes modelos patológicos (Diop-Frimpong et al., 2011; Ibanez et al., 2007), justificando los hallazgos reportados en el presente trabajo.

Considerando la histoarquitectura de la glándula mamaria, los adipocitos constituyen, junto con las células epiteliales, los principales tipos celulares. Por lo tanto, existe la posibilidad de que ambos se vean afectados por el bloqueo de la señalización de AT1-R, principalmente durante la segunda fase de la involución mamaria, en la cual la población de adipocitos crece significativamente. En este trabajo, mostramos que el tejido adiposo expresa los componentes del RAS, necesarios para que el sistema funcione localmente (**Figura R-5**). Resulta interesante que, las glándulas mamarias involucionadas de ratones tratados con losartan, muestran un retraso en el reemplazo tisular con adipocitos, comparado con las mamas control. Previamente, ya había sido reportado que, tanto los pre-adipocitos como los adipocitos, expresan AT1-R y AT2-R (Yvan-Charvet and Quignard-Boulangé, 2011). Asimismo, se ha demostrado que AngII induce la expresión del ARNm de ciclina D1 y la progresión a la fase G1 del ciclo celular, en pre-adipocitos humanos. Por lo tanto, AngII regularía la diferenciación adipocitaria (Crandall et al., 1999). A partir de estos antecedentes y de los resultados obtenidos, postulamos dos posibles fuentes de expresión del RAS local en la glándula mamaria: por un lado el componente epitelial, y por otro, el componente integrado por el tejido adiposo, siendo capaz de afectar a ambos tipos celulares, regulando su proliferación, diferenciación y supervivencia.

Por último, la importancia de los resultados obtenidos a partir del bloqueo farmacológico de AT1-R, nos condujo a utilizar una segunda estrategia que nos permitiera evaluar la relevancia de ambas isoformas del receptor AT1-R murino, durante la involución mamaria. Cabe destacar, que ambas isoformas poseen una homología sustancial en su secuencia de ADN, pero difieren en su distribución y regulación entre los diferentes tejidos y tipos celulares (Burson et al., 1994). Asimismo, éstas son farmacológicamente indistinguibles y, por ende, el uso de ratones genéticamente modificados resulta una aproximación alternativa para determinar el rol de AT1a-R y AT1b-R *in vivo*. En roedores, se ha demostrado que la mayor parte de las funciones más relevantes de AngII en los sistemas cardiovascular y renal, son mediadas por AT1a-R (Clauser et al., 1996). Sin embargo, poco se conoce acerca del rol del subtipo AT1b-R, en aquellas células que lo expresan. Por un lado, se sugiere que éste podría ser redundante, compartiendo propiedades funcionales con el subtipo AT1a-R (Rahman et al., 2004). Por el

contrario, cada vez es mayor la evidencia que sostiene que ambas isoformas del receptor AT1-R, no sólo difieren en su distribución y regulación, sino también en su función (Zhou et al., 2005). El uso de ratones *KO* para AT1a-R y/o AT1b-R en este trabajo, nos permitió demostrar que ambos subtipos se expresan en la glándula mamaria normal, cumpliendo funciones redundantes durante la regresión post-lactancia. No obstante, parecería que AT1a-R posee un rol más crítico, considerando que su histoarquitectura es más drástica que la de AT1b-R durante el retardo observado en la involución (**Figura R-16A**). Finalmente, a través de esta segunda estrategia, observamos un retraso en el remodelado tisular, así como una disminución significativa en los niveles de apoptosis, en ratones AT1-R deficientes (AT1a/AT1b DKO) (**Figura 16B y 17**).

En el presente trabajo, demostramos por primera vez, la existencia de un RAS local o tisular en la glándula mamaria. AngII, el principal péptido efector del sistema, cumple un rol crítico en la involución mamaria post-lactancia, regulando, a través de su receptor AT1-R, los principales eventos asociados a dicho proceso.

Capítulo 2.

2. Ang-(1-7:) un nuevo péptido que contrarresta los efectos pro-tumorales del eje ECA/AngII/AT1-R.

La concepción del RAS durante los últimos 10 años, ha cambiado de forma drástica. Esto se debió no sólo a la aparición del concepto del RAS tisular o local, sino también al descubrimiento de nuevos péptidos bioactivos y enzimas intermediarias. El surgimiento de una visión contemporánea del RAS, se debe principalmente al descubrimiento de la carboxipeptidasa ECA2, cuya principal función es la de convertir AngII en otro péptido bioactivo: la Ang-(1-7) (Donoghue et al., 2000). Al igual que la AngII, la Ang-(1-7) ejerce su acción a través de la unión a un receptor específico de membrana, el MAS-R (Santos et al., 2003). Resulta interesante destacar que, si bien la estructura de ambos péptidos difiere únicamente en un aminoácido, en los últimos años se ha aceptado la hipótesis que Ang-(1-7) posee roles contrapuestos a AngII. En este sentido, se han reportado efectos anti-proliferativos y anti-angiogénicos de Ang-(1-7) en diversos tipos celulares y tejidos, principalmente en condiciones patológicas (Cook et al., 2010; Murugan et al., 2015; Pei et al., 2016; Soto-Pantoja et al., 2009; Su et al., 2006). De esta forma, el eje ECA2/Ang-(1-7)/MAS-R se ha convertido, en el foco de investigación del RAS contemporáneo.

Si bien el principal motivo de estudio en torno al RAS aún continúan siendo las enfermedades cardiovasculares, hepáticas y renales, en los últimos años se ha comenzado a hacer hincapié en la contribución (directa o indirecta) de dicho sistema en el desarrollo de diferentes tipos de tumores. En este sentido, diversos estudios han demostrado los potenciales efectos anti-tumorales de antagonistas del receptor de AngII, AT1-R (Alhusban et al., 2014; Diop-Frimpong et al., 2011; Kim et al., 2014; Rhodes et al., 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos interesó comenzar a estudiar si Ang-(1-7) es capaz de contrarrestar los efectos de AngII en tumores mamarios, en los cuales la funcionalidad del eje ECA2/Ang-(1-7)/MAS-R ha sido poco descripta.

2.1 Ang-(1-7) contrarresta los efectos de AngII, respecto a la activación de factores de supervivencia y MAPKs, en células epiteliales mamarias no tumorales.

De acuerdo a los datos publicados, la desregulación de la vía de PI3K/AKT ocurre en más del 70% de los tumores mamarios (Müller et al., 2001). Estudios preexistentes, han demostrado que AngII posee un efecto dosis dependiente en la proliferación y supervivencia celular, a través de la vía de PI3K/AKT (Zhao et al., 2008, 2010). Por el contrario, un estudio reciente realizado en cardiomiocitos, destacó el efecto inhibitorio de Ang-(1-7) sobre la activación de genes vinculados a hipertrofia mediada por AngII (Dias-Peixoto et al., 2008). Por otro lado, tal como se destacó anteriormente, AngII es un conocido activador de la vía de ERK1/2, a través de la cual estimula una serie de respuestas celulares, vinculadas al crecimiento celular, la diferenciación, la migración y la supervivencia (Ramkhelawon et al., 2013; Su et al., 2006; Touyz et al., 1999; Yang et al., 2005). Asimismo, los trabajos publicados en la literatura durante la última década, vinculan las propiedades anti-angiogénicas y anti-proliferativas de Ang-(1-7) con una disminución de la expresión de VEGF, como consecuencia de la inhibición de las vías de ERK1/2 y COX-2 (Gallagher and Tallant, 2004; Zhang et al., 2010). Si bien las señales de supervivencia se vinculaban primeramente a la vía de PI3K/AKT, la evidencia de una señalización dependiente de la activación de ERK1/2, es cada vez mayor. Principalmente en tumores, el remodelado de las vías de supervivencia, depende de las mutaciones en los diferentes oncogenes y, por ende, prevalece la activación de una u otra vía (Balmanno and Cook, 2009).

En el presente trabajo, estudiamos si Ang-(1-7) era capaz de modular los efectos de AngII, respecto a la activación de AKT y ERK1/2, en células epiteliales mamarias NMuMG. Demostramos que si bien ambas angiotensinas activan AKT y ERK1/2, el estímulo concomitante de ambas revela un perfil de activación semejante al de Ang-(1-7), anulando así los efectos de AngII (**Figura R-19A y B; R-21A y B**). Los efectos diferenciales de AngII y Ang-(1-7) concuerdan con los antecedentes ya mencionados en otros sistemas celulares, tales como células de origen renal (Su et al., 2006) y vasculares de músculo liso (Tallant and Clark, 2003).

Por último, el uso de antagonistas específicos para los receptores de ambos péptidos, nos permitió corroborar que AT1-R y MAS-R son los principales responsables de la activación de AKT y ERK1/2, mediada por AngII y Ang-(1-7) respectivamente. Las evidencias existentes respecto a una interacción entre Ang-

(1-7) y el receptor AT2-R son controversiales (Bosnyak et al., 2011; Gembardt et al., 2012). Particularmente en células epiteliales mamarias NMuMG, no encontramos un efecto significativo respecto de la señalización de Ang-(1-7) a través de AT2-R, o incluso de AT1-R.

2.2 Análisis de los efectos de AngII y Ang-(1-7) sobre la Transición Epitelio Mesenquimal (TEM), en células epiteliales mamarias no tumorales.

La evidencia acumulada en los últimos años, destaca principalmente la importancia de los eventos asociados a la TEM en la transformación maligna, favoreciendo el desarrollo de un fenotipo agresivo e invasivo, en las células cancerosas incipientes (Oh et al., 2016). Particularmente en células de cáncer de mama, la sobreexpresión de AT1-R induce la TEM, promoviendo el crecimiento tumoral, la angiogénesis, e incrementando la capacidad migratoria e invasiva de las mismas (Oh et al., 2016). Además, las células adquieren una morfología tipo mesenquimal, producto de la desestabilización de las uniones célula-célula, la extensa reorganización del citoesqueleto de actina y el incremento en el contacto de las células epiteliales con la MEC (Xu et al., 2009; Yilmaz and Christofori, 2009). Por otro lado, las alteraciones morfológicas y funcionales, pueden explicarse desde el punto de vista transcripcional. Diversos factores de transcripción, principalmente los de la familia Snail y Smad, así como la citoquina extracelular TGF- β , promueven la regulación de marcadores de la TEM (Janda et al., 2002; Thiery and Sleeman, 2006). En este trabajo, demostramos que AngII induce la TEM en células epiteliales mamarias no tumorales NMuMG, provocando una disminución de los niveles de ARNm del marcador epitelial E-cadh e incrementando la expresión de los marcadores mesenquimales N-cadh, FN y α -SMA (**Figura R-24**). Nuestros resultados, coinciden con lo reportado anteriormente en otras líneas celulares. Por otro lado, células tumorales mamarias que sobreexpresan AT1-R, presentan un aumento en la acumulación nuclear de pSmad3 y Snail, altos niveles de Smad4 y N-cadh y pérdida de E-cadh (Oh et al., 2016). Por el contrario, la inhibición de Smad4 suprime las respuestas inducidas por TGF- β asociadas a EMT, en células NMuMG (Deckers et al., 2006). Asimismo, estudios recientes reportaron que la estimulación de AT1-R por AngII, induce la TEM a través de la señalización de Smad, en células epiteliales renales y vasculares de músculo liso *in vitro* (Carvajal et al., 2008; Yang et al., 2010). Sin embargo, aún no existen evidencias del rol de Ang-(1-7) sobre la TEM, en células epiteliales mamarias. Por primera vez, demostramos que Ang-(1-7) es capaz de anular los

efectos mediados por AngII sobre la TEM, ya que los niveles de expresión de los marcadores analizados, no se alteran respecto al control, en células pre-tratadas con Ang-(1-7) (**Figura R-24**). Es interesante destacar que, un incremento de marca positiva para E-cadh en dichas células, favorece las uniones intercelulares y de las células con su MEC, disminuyendo así la capacidad migratoria de las mismas.

Por otro lado, se sabe que la regulación de E-cadh se ve afectada por numerosas vías de transducción de señales, siendo la regulación hacia abajo de los niveles de expresión de dicha proteína, uno de los eventos moleculares más críticos de la TEM. Recientemente, se ha demostrado que AKT reprime la transcripción génica de E-cadherina, favoreciendo la transformación de células epiteliales hacia un fenotipo mesenquimal e invasivo (Larue and Bellacosa, 2005). Asimismo, se ha reportado que células que producen AKT activa de manera constitutiva, producen el factor de transcripción Snail, el cual se sabe reprime la expresión del gen de E-cadh (Grille et al., 2003). A través de la pre-incubación de células NMuMG con el inhibidor de AKT, A6730, demostramos que la inducción de la TEM mediada AngII/AT1-R, depende de la activación de dicha quinasa, en células NMuMG (**Figura R-25**).

Un mayor número de estudios son necesarios para poder dilucidar claramente el rol de AngII/AT1-R en la regulación de la TEM en cáncer de mama. Asimismo, determinar claramente el rol antagónico de Ang-(1-7) y su influencia sobre los efectos de AngII en dicho proceso, también resulta crucial a la hora de pensar en terapias anti-metastásicas, que apunten a la inhibición de la migración, invasión y angiogénesis.

2.3. Ang-(1-7) inhibe los efectos pro-angiogénicos y pro-invasivos mediados por AngII.

Tal como se destacó previamente, la participación del eje ECA/AngII/AT1-R en los procesos de angiogénesis, migración e invasión tumoral, incrementa el riesgo de desarrollar metástasis en pacientes de alto riesgo (Egami et al., 2003). Se ha demostrado que la sobreexpresión de AT1-R en células de cáncer de mama, promueve dichos procesos tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Rhodes et al., 2009). Asimismo, un modelo *in vivo* de metástasis en células tumorales D3H2LN, reveló que AngII acelera la formación de focos metastásicos en sitios secundarios (Rodrigues-Ferreira et al., 2012). De acuerdo con los datos ya publicados, comprobamos que AngII promueve la migración e invasión de células tumorales mamarias triple negativas MDA MB-231 (Rodrigues-Ferreira et al., 2012), así como la migración de la línea celular tumoral LM3 (**Figura R-26 y R-**

27). Por el contrario, Ang-(1-7) no induce migración es las líneas tumorales mencionadas. Sin embargo, al tratar las células con ambas angiotensinas, se revierte significativamente tanto la migración como la invasión tumoral desencadenada por AngII.

Se sabe que la transformación de un fenotipo epitelial hacia un fenotipo mesenquimal, es una de las características necesarias para que una célula tumoral incipiente adquiriera la capacidad de migrar e invadir. En este sentido, para que una célula tumoral adquiriera la capacidad de hacer metástasis, debe superar la muerte celular programada por *anoikis*. La mayoría de las vías, a través de las cuales la célula tumoral resiste a dicho proceso, se vinculan a la TEM. La pérdida de expresión de E-cadh y el incremento en los niveles de expresión de N-cadh, es uno de los principales ejemplos (Derksen et al., 2006). Estos datos, explicarían la tendencia obtenida respecto a la incidencia de Ang-(1-7) sobre los efectos de AngII en los ensayos de TEM, migración e invasión realizados en este estudio. Dichos hallazgos resultan interesantes ya que, hasta el momento, no se registraron datos relevantes respecto a la capacidad de Ang-(1-7) para contrarrestar y anular el rol de AngII en procesos pro-metastásicos en la glándula mamaria.

Debido a su actividad proteolítica, las MMPs cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la TEM, así como en la inducción de los fenómenos de invasión y metástasis tumoral, participando de la degradación de la MEC y la membrana basal (Egeblad and Werb, 2002; Heerboth et al., 2015). Particularmente la MMP-9, juega un papel preponderante en la migración e invasión de células de cáncer de mama (Zhao et al., 2014). Actualmente, se ha reportado que AngII incrementa los niveles de expresión de MMP-2/MMP-9 y de la molécula de adhesión intercelular ICAM-1, en células tumorales mamarias D3H2LN (Rodrigues-Ferreira et al., 2012). Asimismo, el bloqueo de MMP-2 y MMP-9 mediante ARNsi en células MDA MB-231, suprime significativamente la migración inducida por AngII (Zhao et al., 2014). Si bien Zhao et al. ya habían mostrado que AngII promueve la activación de MMP-9 en células MDA MB-231, nosotros encontramos que Ang-(1-7) contrarresta de manera significativa, la activación de dicha MMP inducida por AngII (**Figura R-29B y C**).

Por otro lado, existen evidencias que demuestran la participación de AngII/AT1-R en la regulación de la angiogénesis tumoral. Éste es probablemente uno de los principales mecanismos a través del cual dicho eje del RAS ejerce sus efectos pro-tumorales (Huang et al., 2008). De esta forma, AngII activa diversos factores de transcripción, siendo VEGF uno de los más relevantes (Ager et al., 2008). Reportes de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, muestran la

existencia de una correlación entre la expresión de AngII y VEGF en diversos tipos de tumores, incluyendo tumores de mama (Chen et al., 2013; Jethon et al., 2012). Nosotros detectamos un aumento significativo de los niveles de ARNm de VEGF, en células tumorales MDA MB-231 estimuladas con AngII (**Figura R29A**). Por otro lado, se han publicado una serie de trabajos que muestran los efectos anti-angiogénicos de Ang-(1-7) en diferentes tipos de tumores. En xenotransplantes de tumores de pulmón humanos, dicho péptido redujo los niveles de VEGF y la densidad vascular (Soto-Pantoja et al., 2009). Asimismo, en un estudio clínico de fase I, Ang-(1-7) ha demostrado ser una droga de primera línea, ligada a la disminución de los niveles del factor de crecimiento placentario (PIGF) (Petty et al., 2009). Por último, se ha reportado recientemente que Ang-(1-7) disminuye el crecimiento celular y la angiogénesis en xenotransplantes de carcinoma nasofaríngeo humano (Pei et al., 2016). Nuestros resultados muestran que Ang-(1-7) no altera los niveles de VEGF en células MDA MB-231. Sin embargo demostramos que la estimulación concomitante de ambos péptidos bloquea la inducción de la expresión de VEGF desencadenada por AngII (**Figura 29A**).

Hasta el momento no existen evidencias que indiquen que Ang-(1-7) anula los eventos pro-metastásicos inducidos por AngII en cáncer de mama. A través de este trabajo, demostramos que Ang-(1-7) contrarresta los efectos de AngII, en la inducción de la TEM y en la migración e invasión tumoral, alterando además, los niveles de expresión y/o actividad de VEGF y MMP-9. Sería relevante llevar a cabo estudios in vivo que involucren tratamientos prolongados con Ang-(1-7), para comprender con claridad el rol de dicho heptapéptido en cáncer de mama. Asimismo, es preciso comparar los efectos de Ang-(1-7) con los de antagonistas del receptor AT1-R, tales como losartan o irbesartan, para determinar cuál es la alternativa más efectiva para contrarrestar los efectos de AngII en la progresión metastásica de tumores mamarios.

CONCLUSIONES

Conclusiones:

- Por primera vez, se ha descrito la existencia de un patrón de expresión definido de los componentes del RAS durante la involución mamaria post-lactancia
- La AngII, principal péptido efector del RAS, es un nuevo factor que actúa a nivel local en la mama, induciendo apoptosis y activación de las vías de señalización de STAT3 y ERK1/2, a través de la interacción con su receptor AT1-R.
- El eje ECA/AngII/AT1-R cumple un rol crítico en el proceso de involución mamaria post-lactancia. La ausencia de interacción de AngII con su principal receptor, produce un retardo significativo en la involución e inhibición de la apoptosis, acompañado por un aumento de los niveles de factores de supervivencia AKT y BCL-XL, así como por una disminución de la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, y de la expresión de los factores locales LIF y TNF- α .
- AngII y Ang-(1-7), a través de sus receptores AT1-R y MAS-R respectivamente, inducen la activación del factor de supervivencia AKT y la MAPK ERK1/2, en células epiteliales mamarias no tumorales. Sin embargo, en presencia de Ang-(1-7), se anulan los efectos desencadenados por AngII.
- AngII induce la TEM de células epiteliales mamarias, a través de la activación de AKT. Ang-(1-7) inhibe significativamente los efectos desencadenados por AngII en dicho proceso.
- Se ha demostrado por primera vez, que Ang-(1-7) disminuye significativamente la capacidad migratoria e invasiva de células tumorales mamarias metastásicas, así como los niveles de expresión y/o actividad de marcadores vinculados a la angiogénesis tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Abell, K., Bilancio, A., Clarkson, R.W.E., Tiffen, P.G., Altaparmakov, A.I., Burdon, T.G., Asano, T., Vanhaesebroeck, B., and Watson, C.J. (2005). Stat3-induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. *Nat. Cell Biol.* 7, 392–398.
- Acharya, K.R., Sturrock, E.D., Riordan, J.F., and Ehlers, M.R.W. (2003). ACE revisited: a new target for structure-based drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 891–902.
- Ackler, S., Ahmad, S., Tobias, C., Johnson, M.D., and Glazer, R.I. (2002). Delayed mammary gland involution in MMTV-AKT1 transgenic mice. *Oncogene* 21, 198–206.
- Acosta, J.J., Muñoz, R.M., González, L., Subtil-Rodríguez, A., Dominguez-Caceres, M.A., García-Martínez, J.M., Calcabrini, A., Lazaro-Trueba, I., and Martín-Pérez, J. (2003). Src mediates prolactin-dependent proliferation of T47D and MCF7 cells via the activation of focal adhesion kinase/Erk1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Mol. Endocrinol.* 17, 2268–2282.
- Ager, E.I., Neo, J., and Christophi, C. (2008). The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis* 29, 1675–1684.
- Albiston, A.L., Peck, G.R., Yeatman, H.R., Fernando, R., Ye, S., and Chai, S.Y. (2007). Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: Heads and tails? *Pharmacol. Ther.* 116, 417–427.
- Alenina, N., Xu, P., Rentzsch, B., Patkin, E.L., and Bader, M. (2008). Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp. Physiol.* 93, 528–537.
- Alhusban, A., Al-Azayzih, A., Goc, A., Gao, F., Fagan, S.C., and Payaningal, R.S. (2014). Clinically Relevant Doses of Candesartan Inhibit Growth of Prostate Tumor Xenografts In Vivo through Modulation of Tumor Angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* Sept. 350, 635–645.
- Allred, a J., Diz, D.I., Ferrario, C.M., and Chappell, M.C. (2000). Pathways for angiotensin-(1---7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, F841–F850.
- American Cancer Society (2016). *Cancer Facts & Figures 2016*.
- Arora, P., Cuevas, B.D., Russo, A., Johnson, G.L., and Trejo, J. (2008). Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene* 27, 4434–4445.
- Attoub, S., Gaben, A.M., Al-Salam, S., Al Sultan, M.A.H., John, A., Nicholls, M.G., Mester, J., and Petroianu, G. (2008). Captopril as a potential inhibitor of lung tumor growth and metastasis. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 65–72.
- Bader, M. (2013). ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: The other side of the coin. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 465, 79–85.
- Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Müller, D.N., Luft, F.C., and Ganten, D. (2001). Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J. Mol. Med. (Berl)*. 79, 76–102.
- Ball, R.K., Friis, R.R., Schoenenberger, C.A., Doppler, W., and Groner, B. (1988). Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* 7, 2089–2095.
- Balmanno, K., and Cook, S.J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* 16, 368–377.

- Basso, N., and Terragno, N.A. (2001). History About the Discovery of the Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 38, 1246–1249.
- Baxter, F.O., Came, P.J., Abell, K., Kedjouar, B., Huth, M., Rajewsky, K., Pasparakis, M., and Watson, C.J. (2006). IKK β /2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development* 133, 3485–3494.
- Baxter, F.O., Neoh, K., and Tevendale, M.C. (2007). The beginning of the end: Death signaling in early involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12, 3–13.
- Bosnyak, S., Jones, E.S., Christopoulos, A., Aguilar, M.-I., Thomas, W.G., and Widdop, R.E. (2011). Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin. Sci. (Lond)*. 121, 297–303.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brenner, B.M., Cooper, M.E., de Zeeuw, D., Keane, W.F., Mitch, W.E., Parving, H.H., Remuzzi, G., Snapinn, S.M., Zhang, Z., Shahinfar, S., et al. (2001). Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 345, 861–869.
- BRESCIANI, F. (1965). Effect of Ovarian Hormones on Duration of Dna Synthesis in Cells of the C3H Mouse Mammary Gland. *Exp. Cell Res.* 38, 13–32.
- Browatzki, M., Larsen, D., Pfeiffer, C.A.H., Gehrke, S.G., Schmidt, J., Kranzhofer, A., Katus, H.A., and Kranzhofer, R. (2005). Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *J. Vasc. Res.* 42, 415–423.
- Burrell, L.M., Risvanis, J., Kubota, E., Dean, R.G., MacDonald, P.S., Lu, S., Tikellis, C., Grant, S.L., Lew, R.A., Smith, A.I., et al. (2005). Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur. Heart J.* 26, 369–375.
- Burson, J.M., Aguilera, G., Gross, K.W., and Sigmund, C.D. (1994). Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol* 267, E260–E267.
- Busche, S., Gallinat, S., Bohle, R.M., Reinecke, A., Seebeck, J., Franke, F., Fink, L., Zhu, M., Sumners, C., and Unger, T. (2000). Expression of angiotensin AT(1) and AT(2) receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am. J. Pathol.* 157, 605–611.
- Carey, R.M., Wang, Z.Q., and Siragy, H.M. (2000). Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 35, 155–163.
- Carvajal, G., Rodríguez-Vita, J., Rodríguez-Díez, R., Sánchez-López, E., Rupérez, M., Cartier, C., Esteban, V., Ortiz, A., Egido, J., Mezzano, S. a, et al. (2008). Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int.* 74, 585–595.
- Cassis, L., Saye, J., and Peach, M. (1988). Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 11, 591–596.
- CATANZARO, D.F. (2005). Physiological Relevance of Renin/Prorenin Binding and Uptake. *Hypertens. Res.* 28, 97–105.

- Chae, Y.K., Brown, E.N., Lei, X., Melhem-Bertrandt, A., Giordano, S.H., Litton, J.K., Hortobagyi, G.N., Gonzalez-Angulo, A.M., and Chavez-MacGregor, M. (2013). Use of ACE Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers and Primary Breast Cancer Outcomes. *J. Cancer* 4, 549–556.
- Chae, Y.K., Valsecchi, M.E., Kim, J., Bianchi, A.L., Khemasuwan, D., Desai, A., and Tester, W. (2011). Reduced Risk of Breast Cancer Recurrence in Patients Using ACE Inhibitors, ARBs, and/or Statins. *Cancer Invest.* 29, 585–593.
- Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R., and Watson, C.J. (1999). Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev.* 13, 2604–2616.
- Chauhan, V.P., Martin, J.D., Liu, H., Lacorre, D.A., Jain, S.R., Kozin, S. V., Stylianopoulos, T., Mousa, A.S., Han, X., Adstamongkonkul, P., et al. (2013). Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nat. Commun.* 4, 2516.
- Chen, X., Meng, Q., Zhao, Y., Liu, M., Li, D., Yang, Y., Sun, L., Sui, G., Cai, L., and Dong, X. (2013). Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit cell proliferation and angiogenesis in breast cancer. *Cancer Lett.* 328, 318–324.
- Cheung, C.T., Bendris, N., Paul, C., Hamieh, A., Anouar, Y., Hahne, M., Blanchard, J.M., and Lemmers, B. (2015). Cyclin A2 modulates EMT via β -catenin and phospholipase C pathways. *Carcinogenesis* 36, 914–924.
- Clarke, C., Flores-Muñoz, M., McKinney, C. a, Milligan, G., and Nicklin, S. a (2013). Regulation of cardiovascular remodeling by the counter-regulatory axis of the renin-angiotensin system. *Future Cardiol.* 9, 23–38.
- Clarkson, R.W.E., Wayland, M.T., Lee, J., Freeman, T., and Watson, C.J. (2004). Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Res.* 6, R92–R109.
- Clauser, E., Curnow, K.M., Davies, E., Conchon, S., Teutsch, B., Vianello, B., Monnot, C., and Corvol, P. (1996). Angiotensin II receptors: Protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. *Eur. J. Endocrinol.* 134, 403–411.
- Coates, D. (2003). The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 769–773.
- Cook, K.L., Metheny-Barlow, L.J., Tallant, E.A., and Gallagher, P.E. (2010). Angiotensin-(1-7) reduces fibrosis in orthotopic breast tumors. *Cancer Res.* 70, 8319–8328.
- Corvol, P., Michaud, A., Soubrier, F., and Williams, T.A. (1995). Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J. Hypertens. Suppl.* 13, S3–S10.
- Cory, a H., Owen, T.C., Barltrop, J. a, and Cory, J.G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3, 207–212.
- Crackower, M. a, Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S.E., Oliveira-dos-Santos, A.J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., et al. (2002). Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417, 822–828.
- Crandall, D.L., Armellino, D.C., Busler, D.E., McHendry-Rinde, B., and Kral, J.G. (1999). Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology* 140, 154–158.
- CS, N. (1974). *Physiological actions of prolactin* (Baltimore: Williams and Wilkins).

- da Silveira, K.D., Coelho, F.M., Vieira, A.T., Sachs, D., Barroso, L.C., Costa, V.V., Bretas, T.L.B., Bader, M., de Sousa, L.P., da Silva, T.A., et al. (2010). Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J. Immunol.* 185, 5569–5576.
- Dahlof, B., Devereux, R., De Faire, U., Fyhrquist, F., Hedner, T., Ibsen, H., Julius, S., Kjeldsen, S., Kristianson, K., Lederballe-Pedersen, O., et al. (1997). The Losartan Intervention For Endpoint reduction (LIFE) in Hypertension study rationale, design, and methods. *Am. J. Hypertens.* 10, 705–713.
- Danielson, K.G., Oborn, C.J., Durban, E.M., Butel, J.S., and Medina, D. (1984). Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vivo and functional differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3756–3760.
- De Gasparo, M. (2002). [AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features]. *Drugs* 62 Spec No, 1–10.
- de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415–472.
- De Paepe, B., Verstraeten, V.L., De Potter, C.R., and Bullock, G.R. (2002). Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem. Cell Biol.* 117, 13–19.
- Deckers, M., van Dinther, M., Buijs, J., Que, I., Löwik, C., van der Pluijm, G., ten Dijke, P., Dinther, M., van, Buijs, J., and Que, I. (2006). The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 2202–2209.
- Derksen, P.W.B., Liu, X., Saridin, F., van der Gulden, H., Zevenhoven, J., Evers, B., van Beijnum, J.R., Griffioen, A.W., Vink, J., Krimpenfort, P., et al. (2006). Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* 10, 437–449.
- Deschepper, C.F. (1994). Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int.* 46, 1561–1563.
- Dézi CA (2016). The Different Therapeutic Choices with ARBs. Which One to Give? When? Why?. *Am J Cardiovasc Drugs*.
- Dias-Peixoto, M.F., Santos, R.A.S., Gomes, E.R.M., Alves, M.N.M., Almeida, P.W.M., Greco, L., Rosa, M., Fauler, B., Bader, M., Alenina, N., et al. (2008). Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 52, 542–548.
- Diop-Frimpong, B., Chauhan, V.P., Krane, S., Boucher, Y., and Jain, R.K. (2011). Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2909–2914.
- Diop-Frimpong, B., Chauhan, V.P., Krane, S., Boucher, Y., and Jain, R.K. (2011). Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2909–2914.
- Dohi, Y., Hahn, a. W., Boulanger, C.M., Buhler, F.R., and Luscher, T.F. (1992). Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 19, 131–137.

- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., et al. (2000). A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87, e1–e9.
- Doobay, M.F., Talman, L.S., Obr, T.D., Tian, X., Davisson, R.L., and Lazartigues, E. (2007). Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R373–R381.
- Dzau, V.J., Colucci, W.S., Williams, G.H., Curfman, G., Meggs, L., and Hollenberg, N.K. (1980). Sustained effectiveness of converting-enzyme inhibition in patients with severe congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 302, 1373–1379.
- Earnshaw, W.C. (1999). A cellular poison cupboard. *Nature* 397, 387, 389.
- Egami, K., Murohara, T., Shimada, T., Sasaki, K.-I., Shintani, S., Sugaya, T., Ishii, M., Akagi, T., Ikeda, H., Matsuishi, T., et al. (2003). Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 112, 67–75.
- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.
- Eguchi, S., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Motley, E.D., and Inagami, T. (2001). Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J. Biol. Chem.* 276, 7957–7962.
- Faulkin, L.J., and Deome, K.B. (1960). Regulation of growth and spacing of gland elements in the mammary fat pad of the C3H mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 24, 953–969.
- Ferrario, C.M. (2002). Angiotensin I, angiotensin II and their biologically active peptides. *J. Hypertens.* 20, 805–807.
- Ferrario, C.M., and Chappell, M.C. (2004). Novel angiotensin peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2720–2727.
- Ferrario, C.M., and Iyer, S.N. (1998). Angiotensin-(1-7): A bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul. Pept.* 78, 13–18.
- Ferreira, A.J., and Santos, R.A.S. (2005). Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38, 499–507.
- Freeman, S. (1980). Multiple Hormone Interactions in the Developmental Biology of the Mammary Gland. *Physiol. Rev.* 60, 1049–1106.
- Fujimoto, Y., Sasaki, T., Tsuchida, A., and Chayama, K. (2001). Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. *FEBS Lett.* 495, 197–200.
- Gallagher, P.E., and Tallant, E.A. (2004). Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis* 25, 2045–2052.
- Gallinat, S., Yu, M., Dorst, A., Unger, T., and Herdegen, T. (1998). Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Mol. Brain Res.* 57, 111–122.

- Garrido, A.M., and Griendling, K.K. (2009). NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 302, 148–158.
- Gasc, J.M., Shanmugam, S., Sibony, M., and Corvol, P. (1994). Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension* 24, 531–537.
- Gearing, D.P., Gough, N.M., King, J. a, Hilton, D.J., Nicola, N. a, Simpson, R.J., Nice, E.C., Kelso, a, and Metcalf, D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* 6, 3995–4002.
- Gembardt, F., Sterner-Kock, A., Imboden, H., Spalteholz, M., Reibitz, F., Schultheiss, H.P., Siems, W.E., and Walther, T. (2005). Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides* 26, 1270–1277.
- Gembardt, F., van Veghel, R., Coffman, T.M., Schultheiss, H.-P., Danser, A.H.J., and Walther, T. (2012). Hemodynamic effects of vasorelaxant compounds in mice lacking one, two or all three angiotensin II receptors. *Hypertens. Res.* 35, 547–551.
- George, A.J., Thomas, W.G., and Hannan, R.D. (2010). The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat. Rev. Cancer* 10, 745–759.
- Gewies A. (2003). Introduction to Apoptosis. *ApoReview* 27.
- Ghiani, B.U., and Masini, M.A. (1995). Angiotensin II binding sites in the rat pancreas and their modulation after sodium loading and depletion. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 111, 439–444.
- Giani, J.F., Mayer, M. a, Muñoz, M.C., Silberman, E. a, Höcht, C., Taira, C. a, Gironacci, M.M., Turyn, D., and Dominici, F.P. (2009). Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E262–E271.
- Gomes, E.R.M., Santos, R.A.S., and Guatimosim, S. (2012). Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *Int. J. Hypertens.* 2012.
- Gomes, L.R., Terra, L.F., Wailemann, R.A., Labriola, L., and Sogayar, M.C. (2012). TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer* 12, 26.
- Goncalves, P.B., Ferreira, R., Gasperin, B., and Oliveira, J.F. (2012). Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. *Reproduction* 143, 11–20.
- Greco, S., Elia, M.G., Muscella, A., Storelli, C., and Marsigliante, S. (2002). AT1 angiotensin II receptor mediates intracellular calcium mobilization in normal and cancerous breast cells in primary culture. *Cell Calcium* 32, 1–10.
- Greco, S., Muscella, A., Elia, M.G., Salvatore, P., Storelli, C., Mazzotta, A., Manca, C., and Marsigliante, S. (2003). Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 196, 370–377.
- Green, K.A., and Lund, L.R. (2005). ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *BioEssays* 27, 894–903.
- Gressner, O.A., Weiskirchen, R., and Gressner, A.M. (2007). Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp. Hepatol.* 6, 7.

- Grille, S.J., Bellacosa, A., Upson, J., Klein-Szanto, A.J., Van Roy, F., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Tschlis, P.N., and Larue, L. (2003). The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.* 63, 2172–2178.
- Gross, V., Obst, M., and Luft, F.C. (2004). Insights into angiotensin II receptor function through AT2 receptor knockout mice. *Acta Physiol Scand* 181, 487–494.
- Gross, V., Schunck, W.H., Honeck, H., Milia, A.F., Kärgel, E., Walther, T., Bader, M., Inagami, T., Schneider, W., and Luft, F.C. (2000). Inhibition of pressure natriuresis in mice lacking the AT2 receptor. *Kidney Int.* 57, 191–202.
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* 22, 2411–2421.
- Gschwind, A., Prenzel, N., and Ullrich, A. (2002). Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res.* 62, 6329–6336.
- Guo, D.F., and Inagami, T. (1994). The genomic organization of the rat angiotensin II receptor AT1B. *BBA - Gene Struct. Expr.* 1218, 91–94.
- Guo, R., Yang, L., Wang, H., Liu, B., and Wang, L. (2008). Angiotensin II induces matrix metalloproteinase-9 expression via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Regul. Pept.* 147, 37–44.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., and Taugner, R. (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70, 1067–1116.
- Han, Y., Runge, M.S., and Brasier, R. (1999). Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ. Res.* 84, 695–703.
- Hanahan, D. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hansen, R. (2000). Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr. Relat. Cancer* 7, 95–113.
- Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R., and Clark, K.L. (2002). Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.* 532, 107–110.
- Haura, E.B., Turkson, J., and Jove, R. (2005). Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pr. Oncol* 2, 315–324.
- Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T., and Barber, D.L. (2011). Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol. Biol. Cell* 22, 4750–4764.
- He, M., He, X., Xie, Q., Chen, F., and He, S. (2006). Angiotensin II induces the expression of tissue factor and its mechanism in human monocytes. *Thromb. Res.* 117, 579–590.
- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., and Sarkar, S. (2015). EMT and tumor metastasis. *Clin. Transl. Med.* 4, 6.

- Hellner, K., Walther, T., Schubert, M., and Albrecht, D. (2005). Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 427–435.
- Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (1998). Think globally , act locally : the making of a mouse mammary gland Think globally , act locally : the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* 12, 449–455.
- Herr, D., Rodewald, M., Fraser, H.M., Hack, G., Konrad, R., Kreienberg, R., and Wulff, C. (2008). Potential role of Renin-Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer. *Gynecol. Oncol.* 109, 418–425.
- Hogg, N. a, Harrison, C.J., and Tickle, C. (1983). Lumen formation in the developing mouse mammary gland. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 73, 39–57.
- Huang, W., Wu, Y.-L., Zhong, J., Jiang, F.-X., Tian, X.-L., and Yu, L.-F. (2008). Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Dig. Dis. Sci.* 53, 1206–1210.
- Humphreys, R.C., Bierie, B., Zhao, L., Regina, R., Levy, D., and Hennighausen, L. (2002). Deletion of Stat3 blocks mammary gland involution and extends functional competence of the secretory epithelium in the absence of lactogenic stimuli. *Endocrinology* 143, 3641–3650.
- Hunyady, L., and Catt, K.J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 20, 953–970.
- Hunyady, L., and Turu, G. (2004). The role of the AT1 angiotensin receptor in cardiac hypertrophy: angiotensin II receptor or stretch sensor? *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 405–408.
- Hutchinson, J., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R., and Muller, W.J. (2001). Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2203–2212.
- Ian Phillips, M., Speakman, E.A., and Kimura, B. (1993). Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul. Pept.* 43, 1–20.
- Ibanez, P., Solis, N., Pizarro, M., Aguayo, G., Duarte, I., Miquel, J.F., Accatino, L., and Arrese, M. (2007). Effect of losartan on early liver fibrosis development in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 846–851.
- Ichiki, T., and Inagami, T. (1995). Expression, genomic organization, and transcription of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene. *Circ. Res.* 76, 693–700.
- Igić R, Škrbić R. (2014). The renin-angiotensin system and its blockers. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 142, 756–763.
- Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11, 69–74.
- Inagami, T. (1999). Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 Suppl 1, S2–S7.
- INVESTIGATORS, T.H.O.P.E.S. (2000). Effects of an Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor, Ramipril on Cardiovascular Events in High-Risk Patients. *N. Engl. J. Med.* 342, 145–153.

- Ioachim, E., Charchanti, A., Briasoulis, E., Karavasilis, V., Tsanou, H., Arvanitis, D.L., Agnantis, N.J., and Pavlidis, N. (2002). Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: Their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur. J. Cancer* 38, 2362–2370.
- Iwai, M., Nakaoka, H., Senba, I., Kanno, H., Moritani, T., and Horiuchi, M. (2012). Possible involvement of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas activation in inhibitory effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on vascular remodeling. *Hypertension* 60, 137–144.
- Iwai, N., Inagami, T., Ohmichi, N., and Kinoshita, M. (1996). Renin is expressed in rat macrophage/monocyte cells. *Hypertension* 27, 399–403.
- J.H., H., T., A., E.H., L., and S., H. (2007). Predictors of distant metastasis and mortality in patients with stage II colorectal cancer. *Am. Surg.* 73, 230–238.
- Jackson, T.R., Blair, L.A., Marshall, J., Goedert, M., and Hanley, M.R. (1988). The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335, 437–440.
- Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., and Grünert, S. (2002). Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* 156, 299–313.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics: 2011. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90.
- Jensen, C., Herold, P., and Brunner, H.R. (2008). Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 399–410.
- Jethon, A., Pula, B., Piotrowska, A., Wojnar, A., Rys, J., Dziegiel, P., and Podhorska-Okolow, M. (2012). Angiotensin II type 1 receptor (AT-1R) expression correlates with VEGF-A and VEGF-D expression in invasive ductal breast cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 18, 867–873.
- Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., and Weiss, A. (1999). Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* 9, 601–604.
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y. La, Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., et al. (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* 4.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 441, 431–436.
- Karlsson, C., Lindell, K., Ottosson, M., Sjöström, L., Carlsson, B., and Carlsson, L.M.S. (1998). Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3925–3929.
- Kassiri, Z., Zhong, J., Guo, D., Basu, R., Wang, X., Liu, P.P., Scholey, J.W., Penninger, J.M., and Oudit, G.Y. (2009). Loss of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates maladaptive left ventricular remodeling in response to myocardial infarction. *Circ. Hear. Fail.* 2, 446–455.
- Katz, M., Amit, I., and Yarden, Y. (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1773, 1161–1176.
- Keizman, D., Huang, P., Eisenberger, M.A., Pili, R., Kim, J.J., Antonarakis, E.S., Hammers, H., and Carducci, M.A. (2011). Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in

- patients with metastatic renal cell carcinoma: A retrospective examination. *Eur. J. Cancer* 47, 1955–1961.
- Kikkawa, F., Mizuno, M., Shibata, K., Kajiyama, H., Morita, T., Nomura, S., and Mizutani, S. (2004). Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 1258–1263.
- Kim, M.A., Yang, D., Kida, K., Molotkova, N., Yeo, S.J., Varki, N., Iwata, M., Dalton, N.D., Peterson, K.L., Siems, W.E., et al. (2010). Effects of ACE2 inhibition in the post-myocardial infarction heart. *J. Card. Fail.* 16, 777–785.
- Kim, S., Toyokawa, H., Yamao, J., Satoi, S., Yanagimoto, H., Yamamoto, T., Hirooka, S., Yamaki, S., Inoue, K., Matsui, Y., et al. (2014). Antitumor effect of angiotensin II type 1 receptor blocker losartan for orthotopic rat pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 43, 886–890.
- Klett C, Hellmann W, M.F. (1988). Angiotensin II controls angiotensinogen secretion at a pretranslational level. ... *Off. J. ...* 6, S442–S445.
- Kobori, H., Harrison-Bernard, L.M., and Navar, L.G. (2001). Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 37, 1329–1335.
- Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Makino, S., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., and Ogawa, S. (1998). Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 82, 244–250.
- Kojima, M., Shiojima, I., Yamazaki, T., Komuro, I., Zou, Z., Wang, Y., Mizuno, T., Ueki, K., Tobe, K., and Kadowaki, T. (1994). Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation* 89, 2204–2211.
- Kosaka, T., Miyajima, A., Takayama, E., Kikuchi, E., Nakashima, J., Ohigashi, T., Asano, T., Sakamoto, M., Okita, H., Murai, M., et al. (2007). Angiotensin II type 1 receptor antagonist as an angiogenic inhibitor in prostate cancer. *Prostate* 67, 41–49.
- Krishnan, B., Smith, T.L., Dubey, P., Zapadka, M.E., Torti, F.M., Willingham, M.C., Tallant, E.A., and Gallagher, P.E. (2013b). Angiotensin-(1-7) attenuates metastatic prostate cancer and reduces osteoclastogenesis. *Prostate* 73, 71–82.
- Krishnan, B., Torti, F.M., Gallagher, P.E., and Tallant, E.A. (2013a). Angiotensin-(1-7) reduces proliferation and angiogenesis of human prostate cancer xenografts with a decrease in angiogenic factors and an increase in sFlt-1. *Prostate* 73, 60–70.
- Kritikou, E. a, Sharkey, A., Abell, K., Came, P.J., Anderson, E., Clarkson, R.W.E., and Watson, C.J. (2003). A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development* 130, 3459–3468.
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Jiang, C., and Penninger, J.M. (2006). Lessons from SARS: Control of acute lung failure by the SARS receptor ACE2. *J. Mol. Med.* 84, 814–820.
- Lang, L. (2006). ACE Inhibitors May Reduce Esophageal Cancer Incidence. *Gastroenterology* 131, 343–344.
- Larue, L., and Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24, 7443–7454.

- Lazard, D., Briend-Sutren, M.M., Villageois, P., Mattei, M.G., Strosberg, A.D., and Nahmias, C. (1994). Molecular characterization and chromosome localization of a human angiotensin II AT2 receptor gene highly expressed in fetal tissues. *Receptors Channels* 2, 271–280.
- Lazaroni, T.L.N., Raslan, A.C.S., Fontes, W.R.P., de Oliveira, M.L., Bader, M., Alenina, N., Moraes, M.F.D., dos Santos, R.A., and Pereira, G.S. (2012). Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 113–123.
- Leal, M.C., Pinheiro, S.V.B., Ferreira, A.J., Santos, R.A.S., Bordoni, L.S., Alenina, N., Bader, M., and de Fran??a, L.R. (2009). The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. *J. Anat.* 214, 736–743.
- Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 18677–18680.
- Leung, P.S. (2004). The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr Protein Pept Sci* 5, 267–273.
- Levy, C.S., Slomiansky, V., Gattelli, A., Nahmod, K., Pelisch, F., Blaustein, M., Srebrow, A., Coso, O.A., and Kordon, E.C. (2010). Tumor necrosis factor alpha induces LIF expression through ERK1/2 activation in mammary epithelial cells. *J Cell Biochem* 110, 857–865.
- Lewis, E.J., Hunsicker, L.G., Clarke, W.R., Berl, T., Pohl, M. a, Lewis, J.B., Ritz, E., Atkins, R.C., Rohde, R., and Raz, I. (2001). Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 345, 851–860.
- Li, C.I., Uribe, D.J., and Daling, J.R. (2005a). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br. J. Cancer* 93, 1046–1052.
- Li, J., Culman, J., Hörtnagl, H., Zhao, Y., Gerova, N., Timm, M., Blume, A., Zimmermann, M., Seidel, K., Dirnagl, U., et al. (2005b). Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J.* 19, 617–619.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K.U., Young, W.S., Hennighausen, L., and Furth, P. a (1997). Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3425–3430.
- Li, Y., Wu, J., He, Q., Shou, Z., Zhang, P., Pen, W., Zhu, Y., and Chen, J. (2009). Angiotensin (1-7) prevent heart dysfunction and left ventricular remodeling caused by renal dysfunction in 5/6 nephrectomy mice. *Hypertens. Res.* 32, 369–374.
- Lieb, W., Graf, J., Götz, A., König, I.R., Mayer, B., Fischer, M., Stritzke, J., Hengstenberg, C., Holmer, S.R., Döring, A., et al. (2006). Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men: Results of the MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *J. Mol. Med.* 84, 88–96.
- Lijnen, H.R. (2001). Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. In *Thrombosis and Haemostasis*, pp. 324–333.
- Lim, K.T., Cosgrave, N., Hill, A.D., and Young, L.S. (2006). Nongenomic oestrogen signalling in oestrogen receptor negative breast cancer cells: a role for the angiotensin II receptor AT1. *Breast Cancer Res.* 8, R33.

- Liu, B.C., Xia, H.L., Wu, J.N., Zhang, X.L., Liu, D.G., and Gong, Y.X. (2007). Influence of irbesartan on expression of ILK and its relationship with epithelial-mesenchymal transition in mice with unilateral ureteral obstruction. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 1810–1818.
- Liu, C., Lv, X.H., Li, H.X., Cao, X., Zhang, F., Wang, L., Yu, M., and Yang, J.K. (2012). Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetol.* 49, 291–299.
- Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 11, 179–186.
- Lotz-Jenne, C., Lüthi, U., Ackerknecht, S., Lehembre, F., Fink, T., Stritt, M., Wirth, M., Pavan, S., Bill, R., Regenass, U., et al. (2016). A high-content EMT screen identifies multiple receptor tyrosine kinase inhibitors with activity on TGF β receptor. *Oncotarget.*
- Louzada, S., Adegá, F., and Chaves, R. (2012). Defining the Sister Rat Mammary Tumor Cell Lines HH-16 cl.2/1 and HH-16.cl.4 as an *In Vitro* Cell Model for *ErbB2*. *PLoS One* 7, e29923.
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Teoh, H., Wang, G., Shukla, P.C., Levitt, K.S., Oudit, G.Y., Al-Omran, M., Stewart, D.J., et al. (2008). Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H1377–H1384.
- Lozano-Ascencio, R., Gómez-Dantés, H., Lewis, S., Torres-Sánchez, L., and López-Carrillo, L. (2009). [Breast cancer trends in Latin America and the Caribbean]. *Salud Publica Mex.* 51 Suppl 2, s147–s156.
- Luchtefeld, M., Grote, K., Grothusen, C., Bley, S., Bandlow, N., Selle, T., Strüber, M., Haverich, A., Bavendiek, U., Drexler, H., et al. (2005). Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 183–188.
- Lund, L.R., Rømer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M.J., Danø, K., and Werb, Z. (1996). Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122, 181–193.
- Luo, Y., Tanabe, E., Kitayoshi, M., Nishiguchi, Y., Fujiwara, R., Matsushima, S., Sasaki, T., Sasahira, T., Chihara, Y., Nakae, D., et al. (2015). Expression of MAS1 in breast cancer. *Cancer Sci.* 106, 1240–1248.
- Maeda, M., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (2005). Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J. Cell Sci.* 118, 873–887.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Marrero, M.B., Schieffer, B., Paxton, W.G., Heerdt, L., Berk, B.C., Delafontaine, P., and Bernstein, K.E. (1995). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375, 247–250.
- Marti, A., Feng, Z., Altermatt, H.J., and Jaggi, R. (1997). Milk accumulation triggers apoptosis of mammary epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 158–165.

Masso-Welch, P.A., Darcy, K.M., Stangle-Castor, N.C., and Ip, M.M. (2000). A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 165–185.

Mc Menamin, Ú.C., Murray, L.J., Cantwell, M.M., and Hughes, C.M. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in cancer progression and survival: a systematic review. *Cancer Causes Control* 23, 221–230.

McKinley, M.J., Albiston, A.L., Allen, A.M., Mathai, M.L., May, C.N., McAllen, R.M., Oldfield, B.J., Mendelsohn, F.A.O., and Chai, S.Y. (2003). The brain renin-angiotensin system: Location and physiological roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 901–918.

Mehta, P.K., and Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 292, C82–C97.

Menard J, Bouhnik J, Clauser E, Richoux JP, C.P. (1983). Biochemistry and regulation of angiotensinogen. *Clin Exp Hypertenstems* 5, 1005–1019.

Menon, J., Soto-Pantoja, D.R., Callahan, M.F., Cline, J.M., Ferrario, C.M., Tallant, E.A., and Gallagher, P.E. (2007). Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. *Cancer Res* 67, 2809–2815.

Metzger, R., Bader, M., Ludwig, T., Berberich, C., Bunnemann, B., and Ganten, D. (1995). Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett.* 357, 27–32.

Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 117–134.

Miettinen, P.J., Ebner, R., Lopez, a R., and Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* 127, 2021–2036.

Miyajima, A., Kosaka, T., Asano, T., Asano, T., Seta, K., Kawai, T., and Hayakawa, M. (2002). Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 62, 4176–4179.

Miyajima, A., Kosaka, T., Kikuchi, E., and Oya, M. (2015). Renin-angiotensin system blockade: Its contribution and controversy. *Int. J. Urol.* 22, 721–730.

Moulik, S., Speth, R.C., Turner, B.B., and Rowe, B.P. (2002). Angiotensin II receptor subtype distribution in the rabbit brain. *Exp Brain Res* 142, 275–283.

Müller, a, Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50–56.

Murugan, D., Lau, Y.S., Lau, W.C., Mustafa, M.R., and Huang, Y. (2015). Angiotensin 1-7 protects against angiotensin II-induced endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction via mas receptor. *PLoS One* 10.

Nahmod, V.E., Finkielman, S., Benarroch, E.E., and Pirola, C.J. (1978). Angiotensin regulates release and synthesis of serotonin in brain. *Science* (80-.). 202, 1091–1093.

- Nakai, Y., Isayama, H., Ijichi, H., Sasaki, T., Sasahira, N., Hirano, K., Kogure, H., Kawakubo, K., Yagioka, H., Yashima, Y., et al. (2010). Inhibition of renin-angiotensin system affects prognosis of advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine. *Br. J. Cancer* 103, 1644–1648.
- Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui, Y., and Yamori, T. (2005). Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol. Cancer Ther.* 4, 399–412.
- Namazi, S., Rostami-Yalmeh, J., Sahebi, E., Jaberipour, M., Razmkhah, M., and Hosseini, A. (2014). The role of captopril and losartan in prevention and regression of tamoxifen-induced resistance of breast cancer cell line MCF-7: An in vitro study. *Biomed. Pharmacother.* 68, 565–571.
- Nandi, S., and MacGrath, C.M. (1973). Mammary neoplasia in mice. *Adv Cancer Res* 17, 353–414.
- Naylor, M.J., Li, N., Cheung, J., Lowe, E.T., Lambert, E., Marlow, R., Wang, P., Schatzmann, F., Wintermantel, T., Sch?etz, G., et al. (2005). Ablation of $\alpha 5$ integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular morphogenesis and differentiation. *J. Cell Biol.* 171, 717–728.
- Ng KK, V.J. (1967). Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* 216, 762–766.
- Nguyen, G., Burcklé, C. a, and Sraer, J.-D. (2004). Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance. *Curr. Hypertens. Rep.* 6, 129–132.
- Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T., and Sraer, J. (2002). Pivotal role of the renin / prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J. Clin. Invest.* 109, 1417–1427.
- Nieto, M.A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* (80-.). 342, 1234850.
- Nishimura, R., and Arima, N. (2008). Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? *Breast Cancer* 15, 303–308.
- Noguchi, R., Yoshiji, H., Ikenaka, Y., Namisaki, T., Kitade, M., Kaji, K., Yoshii, J., Yanase, K., Yamazaki, M., Tsujimoto, T., et al. (2009). Synergistic inhibitory effect of gemcitabine and angiotensin type-1 receptor blocker, losartan, on murine pancreatic tumor growth via anti-angiogenic activities. *Oncol. Rep.* 22, 355–360.
- Oh, E., Kim, J.Y., Cho, Y., An, H., Lee, N., Jo, H., Ban, C., and Seo, J.H. (2016). Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in breast cancer cells induces epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor growth and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1071–1081.
- Ohyama, K., Yamano, Y., Sano, T., Nakagomi, Y., Hamakubo, T., Morishima, I., and Inagami, T. (1995). Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. *Regul. Pept.* 57, 141–147.
- Oliverio, M.I., Kim, H.-S., Ito, M., Le, T., Audoly, L., Best, C.F., Hiller, S., Kluckman, K., Maeda, N., Smithies, O., et al. (1998). Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 15496–15501.
- Pagé, E.L., Robitaille, G. a, Pouysségur, J., and Richard, D.E. (2002). Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J. Biol. Chem.* 277, 48403–48409.

- Pan, J., Fukuda, K., Saito, M., Matsuzaki, J., Kodama, H., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., and Ogawa, S. (1999). Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 84, 1127–1136.
- Parise, C.A., and Caggiano, V. (2014). Breast cancer survival defined by the er/pr/her2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *J. Cancer Epidemiol.* 2014.
- Parkin, D.M. (2004). International variation. *Oncogene* 23, 6329–6340.
- Patel, V.B., Clarke, N., Wang, Z., Fan, D., Parajuli, N., Basu, R., Putko, B., Kassiri, Z., Turner, A.J., and Oudit, G.Y. (2014). Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: A positive feedback mechanism in the RAS. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 66, 167–176.
- Paul, M., Poyan Mehr, A., and Kreutz, R. (2006). Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol. Rev.* 86, 747–803.
- Peeters, A.C.T.M., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Thien, T., and Van Der Meer, J.W.M. (1998). The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti- inflammatory cytokine production. *Immunology* 94, 376–379.
- Pei, N., Wan, R., Chen, X., Li, A., Zhang, Y., Li, J., Du, H., Chen, B., Wei, W., Qi, Y., et al. (2016). Angiotensin-(1-7) Decreases Cell Growth and Angiogenesis of Human Nasopharyngeal Carcinoma Xenografts. *Mol Cancer Ther* 15, 37–47.
- Pereira, R.M., dos Santos, R.A.S., Teixeira, M.M., Leite, V.H.R., Costa, L.P., da Costa Dias, F.L., Barcelos, L.S., Collares, G.B., and Simões e Silva, A.C. (2007). The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J. Hepatol.* 46, 674–681.
- Persson, P.B., Skalweit, A., and Thiele, B.J. (2004). Controlling the release and production of renin. In *Acta Physiologica Scandinavica*, pp. 375–381.
- Petty, W.J., Miller, A.A., McCoy, T.P., Gallagher, P.E., Tallant, E.A., and Torti, F.M. (2009). Phase I and pharmacokinetic study of angiotensin-(1-7), an endogenous antiangiogenic hormone. *Clin. Cancer Res.* 15, 7398–7404.
- Pouysségur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443.
- Probst, W.C., Snyder, L.A., Schuster, D.I., Brosius, J., and Sealfon, S.C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 11, 1–20.
- Puisieux, A., Brabletz, T., and Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* 16, 488–494.
- Quaglino, A., Salierno, M., Pellegrotti, J., Rubinstein, N., and Kordon, E.C. (2009). Mechanical strain induces involution-associated events in mammary epithelial cells. *BMC Cell Biol.* 10, 55.
- Quaglino, A., Schere-Levy, C., Romorini, L., Meiss, R.P., and Kordon, E.C. (2007). Mouse mammary tumors display Stat3 activation dependent on leukemia inhibitory factor signaling. *Breast Cancer Res.* 9, R69.
- Quarrie, L.H., Addey, C.V.P., and Wilde, C.J. (1996). Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *J. Cell. Physiol.* 168, 559–569.

- Rahman, M., Kimura, S., Nishiyama, A., Hitomi, H., Zhang, G., and Abe, Y. (2004). Angiotensin II stimulates superoxide production via both angiotensin AT1A and AT1B receptors in mouse aorta and heart. *Eur. J. Pharmacol.* 485, 243–249.
- Ramkhelawon, B., Rivas, D., and Lehoux, S. (2013). Shear stress activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the angiotensin II type 1 receptor. *FASEB J.* 27, 3008–3016.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 117, 1281–1283.
- Reaux, A., Fournie-Zaluski, M.C., and Llorens-Cortes, C. (2001). Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 157–162.
- Reichardt, H.M., Horsch, K., Gr??ne, H.J., Kolbus, A., Beug, H., Hynes, N., and Sch??tz, G. (2001). Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 519–527.
- Rentzsch, B., Todiras, M., Iliescu, R., Popova, E., Campos, L.A., Oliveira, M.L., Baltatu, O.C., Santos, R.A., and Bader, M. (2008). Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension* 52, 967–973.
- Rhodes, D.R., Ateeq, B., Cao, Q., Tomlins, S. a, Mehra, R., Laxman, B., Kalyana-Sundaram, S., Lonigro, R.J., Helgeson, B.E., Bhojani, M.S., et al. (2009). AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10284–10289.
- Rice, G.I., Thomas, D. a, Grant, P.J., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2004). Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J.* 383, 45–51.
- Richards, E.J., Zhang, G., Li, Z.-P., Permeth-Wey, J., Challa, S., Li, Y., Kong, W., Dan, S., Bui, M., Coppola, D., et al. (2015). Long non-coding RNAs regulated by TGF β : lncRNA-HIT mediated TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition in mammary epithelia. *J. Biol. Chem.* jbc.M114.610915.
- Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., and Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 227–241.
- Riordan, J.F. (2003). Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol.* 4, 225–229.
- Röcken, C., Lendeckel, U., Dierkes, J., Westphal, S., Carl-McGrath, S., Peters, B., Krüger, S., Malfertheiner, P., Roessner, A., and Ebert, M.P. a (2005). The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clin. Cancer Res.* 11, 2526–2530.
- Röcken, C., Röhl, F., Diebler, E., Lendeckel, U., Pross, M., Carl-McGrath, S., and Ebert, M.P.A. (2007). The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1206–1212.
- Rodrigues-Ferreira, S., Abdelkarim, M., Dillenburg-Pilla, P., Luissint, A.-C., di-Tommaso, A., Deshayes, F., Pontes, C.L.S., Molina, A., Cagnard, N., Letourneur, F., et al. (2012). Angiotensin II facilitates breast cancer cell migration and metastasis. *PLoS One* 7, e35667.
- Roks, A.J., and Henning, R.H. (2003). Angiotensin peptides: ready to re(de)fine the angiotensin system? *Hypertension* 21, 1269–1271.

- Romero, C.A., Orias, M., and Weir, M.R. (2015). Novel RAAS agonists and antagonists: clinical applications and controversies. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 242–252.
- Rompe, F., Artuc, M., Hallberg, A., Alterman, M., Ströder, K., Thöne-Reineke, C., Reichenbach, A., Schacherl, J., Dahlöf, B., Bader, M., et al. (2010). Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 55, 924–931.
- Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M., and Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 21, 1323–1333.
- Rosenthal, T., and Gavras, I. (2009). Angiotensin inhibition and malignancies: a review. *J. Hum. Hypertens.* 23, 623–635.
- Ruhe, J.E., Streit, S., Hart, S., Wong, C.-H., Specht, K., Knyazev, P., Knyazeva, T., Tay, L.S., Loo, H.L., Foo, P., et al. (2007). Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67, 11368–11376.
- Ruiz-Ortega, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Ruperez, M., Mezzano, S., Ardiles, L., Justo, P., Ortiz, A., and Egido, J. (2003). Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int.* S21–S26.
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., König, S., Wittig, B., and Egido, J. (2000). Angiotensin II Activates Nuclear Transcription Factor B Through AT1 and AT2 in Vascular Smooth Muscle Cells: Molecular Mechanisms. *Circ. Res.* 86, 1266–1272.
- Rüster, C., and Wolf, G. (2006). Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2985–2991.
- Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H.S., and Izumo, S. (1993). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75, 977–984.
- Santos, R.A.S., Campagnole-Santos, M.J., Baracho, N.C. V, Fontes, M.A.P., Silva, L.C.S., Neves, L.A.A., R. Oliveira, D., Caligorne, S.M., Rodrigues, A.R. V, Gropen, C., et al. (1994). Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): Evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res. Bull.* 35, 293–298.
- Santos, R.A.S., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., et al. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8258–8263.
- Santos, S.H.S., Fernandes, L.R., Mario, ?rica Guilhen, Ferreira, A.V.M., P??rto, L.C.J., Alvarez-Leite, J.I., Botion, L.M., Bader, M., Alenina, N., and Santos, R.A.S. (2008). Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes* 57, 340–347.
- Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J.E., Pratt, R.E., Kobilka, B.K., and Dzau, V.J. (1992). Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 253–259.
- Schere-Levy, C., Buggiano, V., Quaglino, A., Gattelli, A., Cirio, M.C., Piazzon, I., Vanzulli, S., and Kordon, E.C. (2003). Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Exp Cell Res* 282, 35–47.

- Schnitt, S.J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod. Pathol.* 23, S60–S64.
- Schwertfeger, K.L., Richert, M.M., and Anderson, S.M. (2001). Mammary gland involution is delayed by activated Akt in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 15, 867–881.
- Shen, H., Sun, T., and Ferrari, M. (2012). Nanovector delivery of siRNA for cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 19, 367–373.
- Silberstein, G.B., and Daniel, C.W. (1987). Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-beta. *Science* 237, 291–293.
- Silver, R.B., Reid, A.C., Mackins, C.J., Askwith, T., Schaefer, U., Herzlinger, D., and Levi, R. (2004). Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13607–13612.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody Agent Against Her2 For Metastatic Breast Cancer That Overexpresses Her2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792.
- Smith, G.H., and Medina, D. (1988). A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J. Cell Sci.* 90 (Pt 1), 173–183.
- Smith, I., Procter, M., Gelber, R.D., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., et al. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 369, 29–36.
- Smith, N.J., Chan, H.-W., Osborne, J.E., Thomas, W.G., and Hannan, R.D. (2004). Hijacking epidermal growth factor receptors by angiotensin II: new possibilities for understanding and treating cardiac hypertrophy. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2695–2703.
- Soto-Pantoja, D.R., Menon, J., Gallagher, P.E., and Tallant, E.A. (2009). Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1676–1683.
- Soubrier, F., Wei, L., Hubert, C., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F., and Corvol, P. (1993). Molecular Biology of the Angiotensin I Converting Enzyme: II. Structure-function. Gene Polymorphism and Clinical Implications. *J. Hypertens.* 11, 599–604.
- Souza, L.L., and Costa-Neto, C.M. (2012). Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *J. Cell. Physiol.* 227, 2117–2122.
- Staessen, J.A., Li, Y., and Richart, T. (2006). Oral renin inhibitors. *Lancet* 368, 1449–1456.
- Steckelings, U.M., and Unger, T. (2012). Angiotensin II type 2 receptor agonists--where should they be applied? *Expert Opin Investig Drugs* 21, 763–766.
- Sternlicht, M.D., Lochtest, A., Sympson, C.J., Huey, B., Rougier, J.P., Gray, J.W., Pinkel, D., Bissell, M.J., and Werb, Z. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98, 137–146.
- Stewart, B.W., and Wild, C.P. (2014). World cancer report 2014.
- Su, Z., Zimpelmann, J., and Burns, K.D. (2006). Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int.* 69, 2212–2218.

- Suganuma, T., Ino, K., Shibata, K., Kajiyama, H., Nagasaka, T., Mizutani, S., and Kikkawa, F. (2005). Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 11, 2686–2694.
- Suzuki, F., Lindpaintner, K., Keuneke, C., Hellmann, W., Takahasi, S., Nakamura, Y., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Murakami, K., and Ganten, D. (1988). Tissue-specific regulation of gene expression for renin and angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens A* 10, 1317–1319.
- Suzuki, H., and Eguchi, S. (2006). Growth factor receptor transactivation in mediating end organ damage by angiotensin II. *Hypertension* 47, 339–340.
- Tahmasebi, M., Barker, S., Puddefoot, J.R., and Vinson, G.P. (2006). Localisation of renin-angiotensin system (RAS) components in breast. *Br. J. Cancer* 95, 67–74.
- Takeda, H., and Kondo, S. (2001). Differences between squamous cell carcinoma and keratoacanthoma in angiotensin type-1 receptor expression. *Am.J.Pathol.* 158, 1633–1637.
- Takeuchi, K., Alexander, R.W., Nakamura, Y., Tsujino, T., and Murphy, T.J. (1993). Molecular structure and transcriptional function of the rat vascular AT1a angiotensin receptor gene. *Circ Res* 73, 612–621.
- Tallant, E.A., and Clark, M.A. (2003). Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 42, 574–579.
- Tatokoro, M., Fujii, Y., Kawakami, S., Saito, K., Koga, F., Matsuoka, Y., Iimura, Y., Masuda, H., and Kihara, K. (2011). Phase-II trial of combination treatment of interferon- γ , cimetidine, cyclooxygenase-2 inhibitor and renin-angiotensin-system inhibitor (I-CCA therapy) for advanced renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 102, 137–143.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139, 871–890.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.
- Thomas, W.G., and Sernia, C. (1990). The immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat ovary. *Cell Tissue Res.* 261, 367–373.
- Tiffen, P.G., Omidvar, N., Marquez-Almuina, N., Croston, D., Watson, C.J., and Clarkson, R.W.E. (2008). A dual role for oncostatin M signaling in the differentiation and death of mammary epithelial cells in vivo. *Mol. Endocrinol.* 22, 2677–2688.
- Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A., and Smith, R.D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45, 205–251.
- Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., and Turner, A.J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275, 33238–33243.
- Toh, S., Reichman, M.E., Houstoun, M., Ross Southworth, M., Ding, X., Hernandez, A.F., Levenson, M., Li, L., McCloskey, C., Shoaibi, A., et al. (2012). Comparative Risk for Angioedema Associated With the

Use of Drugs That Target the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Arch. Intern. Med.* 172, 1582–1589.

Touyz, R.M., Deng, L.Y., He, G., Wu, X.H., and Schiffrin, E.L. (1999). Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens* 17, 907–916.

Turner, A.J., Tipnis, S.R., Guy, J.L., Rice, G., and Hooper, N.M. (2002). ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallopeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 346–353.

Uemura, H., Ishiguro, H., Nakaigawa, N., Nagashima, Y., Miyoshi, Y., Fujinami, K., Sakaguchi, A., and Kubota, Y. (2003). Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol. Cancer Ther.* 2, 1139–1147.

Urtreger, A.J., Ladeda, V.E., Puricelli, L.I., Rivelli, A., Del Carmen Vidal, M., De Lustig, E.S., and De Bal Kier Joffé, E.D. (1997). Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int. J. Oncol.* 11, 489–496.

Ushio-Fukai, M., Griendling, K.K., Akers, M., Lyons, P.R., and Alexander, R.W. (1998). Temporal Dispersion of Activation of Phospholipase C- β 1 and - γ Isoforms by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 19772–19777.

van Kats, J.P., Danser, a H.J., van Meegen, J.R., Sassen, L.M. a, Verdouw, P.D., and Schalekamp, M. a D.H. (1998). Angiotensin Production by the Heart: A Quantitative Study in Pigs With the Use of Radiolabeled Angiotensin Infusions. *Circulation* 98, 73–81.

van Staveren, W.C.G., Solis, D.Y., Hebrant, A., Detours, V., Dumont, J.E., Maenhaut, C., Solís, D.Y.W., Hébrant, a, Detours, V., Dumont, J.E., et al. (2009). Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim. Biophys. Acta* 1795, 92–103.

Varagic, J., Ahmad, S., Nagata, S., and Ferrario, C.M. (2014). ACE2: Angiotensin II/angiotensin-(1-7) balance in cardiac and renal injury. *Curr. Hypertens. Rep.* 16.

Viazzi, F., Bonino, B., Cappadona, F., and Pontremoli, R. (2016). Renin-angiotensin-aldosterone system blockade in chronic kidney disease: current strategies and a look ahead. *Intern. Emerg. Med.* 1–9.

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., et al. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 277, 14838–14843.

Villar, A.J., and Pedersen, R.A. (1994). Parental imprinting of the Mas protooncogene in mouse. *Nat. Genet.* 8, 373–379.

Villela, D.C., Passos-Silva, D.G., and Santos, R. a S. (2014). Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 23, 130–134.

Vinson, G.P., Barker, S., and Puddefoot, J.R. (2012). The renin-angiotensin system in the breast and breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 19.

- Walsh, L.A., Cepeda, M.A., and Damjanovski, S. (2012). Analysis of the MMP-dependent and independent functions of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on the invasiveness of breast cancer cells. *J. Cell Commun. Signal.* 6, 87–95.
- Walton, K.D., Wagner, K.U., Rucker, E.B., Shillingford, J.M., Miyoshi, K., and Hennighausen, L. (2001). Conditional deletion of the *bcl-x* gene from mouse mammary epithelium results in accelerated apoptosis during involution but does not compromise cell function during lactation. *Mech. Dev.* 109, 281–293.
- Wang, J.M., Tan, J., and Leenen, F.H.H. (2003). Central nervous system blockade by peripheral administration of AT1 receptor blockers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41, 593–599.
- Wang, K., Hu, X., Du, C., Tu, S., Zhang, F., and Xie, X. (2012). Angiotensin-(1-7) suppresses the number and function of the circulating fibrocytes by upregulating endothelial nitric oxide synthase expression. *Mol. Cell. Biochem.* 365, 19–27.
- Warner, F.J., Lew, R.A., Smith, A.I., Lambert, D.W., Hooper, N.M., and Turner, A.J. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *J. Biol. Chem.* 280, 39353–39362.
- Watson, C.J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res.* 8, 203.
- Watson, C.J., and Khaled, W.T. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* 135, 995–1003.
- Watson, C.J., and Kreuzaler, P.A. (2011). Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 757–762.
- Weber, K.T., Swamynathan, S.K., Guntaka, R. V., and Sun, Y. (1999). Angiotensin II and extracellular matrix homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 395–403.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., and Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol. Oncol.* 4, 192–208.
- Williams, J.M., and Daniel, C.W. (1983). Mammary ductal elongation: Differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev. Biol.* 97, 274–290.
- Wilop, S., Von Hobe, S., Crysandt, M., Esser, A., Osieka, R., and Jost, E. (2009). Impact of angiotensin I converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer undergoing first-line platinum-based chemotherapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135, 1429–1435.
- Wolny, A., Clozel, J.-P., Rein, J., Mory, P., Vogt, P., Turino, M., Kiowski, W., and Fischli, W. (1997). Functional and Biochemical Analysis of Angiotensin II-Forming Pathways in the Human Heart. *Circ. Res.* 80, 219–227.
- Wosik, K., Cayrol, R., Dodelet-Devillers, A., Berthelet, F., Bernard, M., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Reudelhuber, T.L., and Prat, A. (2007). Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 27, 9032–9042.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156–172.

- Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Mizuno, T., Takano, H., Hiroi, Y., Ueki, K., Tobe, K., et al. (1995). Angiotensin II Partly Mediates Mechanical Stress Induced Cardiac Hypertrophy. *Circ. Res.* 77, 258–265.
- Yamazato, M., Yamazato, Y., Sun, C., Diez-Freire, C., and Raizada, M.K. (2007). Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 49, 926–931.
- Yang, F., Huang, X.R., Chung, A.C.K., Hou, C.C., Lai, K.N., and Lan, H.Y. (2010). Essential role for Smad3 in angiotensin II-induced tubular epithelial-mesenchymal transition. *J. Pathol.* 221, 390–401.
- Yang, L., Bataller, R., Dulyx, J., Coffman, T.M., Gin??s, P., Rippe, R.A., and Brenner, D.A. (2005). Attenuated hepatic inflammation and fibrosis in angiotensin type 1a receptor deficient mice. *J. Hepatol.* 43, 317–323.
- Yang, W., Huang, W., Su, S., Li, B., Zhao, W., Chen, S., and Gu, D. (2006). Association study of ACE2 (angiotensin I-converting enzyme 2) gene polymorphisms with coronary heart disease and myocardial infarction in a Chinese Han population. *Clin.Sci.(Lond)* 111, 333–340.
- Yang, X., Zhu, M.J., Sreejayan, N., Ren, J., and Du, M. (2005). Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol. Cells* 20, 263–270.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15–33.
- Young, D., O'Neill, K., Jessell, T., and Wigler, M. (1988). Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5339–5342.
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., and Wigler, M. (1986). Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45, 711–719.
- Yvan-Charvet, L., and Quignard-Boulangé, A. (2011). Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney Int.* 79, 162–168.
- Zambidis, E.T., Park, T.S., Yu, W., Tam, A., Levine, M., Yuan, X., Pryzhkova, M., and P??ault, B. (2008). Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 112, 3601–3614.
- Zampetaki, A., Zhang, Z., Hu, Y., and Xu, Q. (2005). Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H2946–H2954.
- Zhang, F., Hu, Y., Xu, Q., and Ye, S. (2010). Different effects of angiotensin ii and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *PLoS One* 5.
- Zhang, L., Ma, Y., Zhang, J., Cheng, J., and Du, J. (2005). A new cellular signaling mechanism for angiotensin II activation of NF-kappaB: An IkappaB-independent, RSK-mediated phosphorylation of p65. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1148–1153.
- Zhang, Y., Lu, J., Shi, J., Lin, X., Dong, J., Zhang, S., Liu, Y., and Tong, Q. (2008). Central administration of angiotensin-(1-7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide

synthase expression following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neuropeptides* 42, 593–600.

Zhao, L., Melenhorst, J.J., and Hennighausen, L. (2002). Loss of interleukin 6 results in delayed mammary gland involution: a possible role for mitogen-activated protein kinase and not signal transducer and activator of transcription 3. *Mol. Endocrinol.* 16, 2902–2912.

Zhao, Y., Chen, X., Cai, L., Yang, Y., Sui, G., and Wu, J. (2008). Angiotensin II suppresses adriamycin-induced apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling in human breast cancer cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 40, 304–310.

Zhao, Y., Chen, X., Cai, L.I., Yang, Y., Sui, G., and Fu, S. (2010). Angiotensin II/Angiotensin II type I receptor (AT1R) signaling promotes MCF-7 breast cancer cells survival via PI3-kinase/Akt pathway. *J. Cell. Physiol.* 225, 168–173.

Zhao, Y., Wang, H., Li, X., Cao, M., Lu, H., Meng, Q., Pang, H., Li, H., Nadolny, C., Dong, X., et al. (2014). Ang II-AT1R Increases Cell Migration Through PI3K/AKT and NF- κ B Pathways in Breast Cancer. *J. Cell. Physiol.* 229, 1855–1862.

Zhou, Y., Dirksen, W.P., Chen, Y., Morris, M., Zweier, J.L., and Periasamy, M. (2005). A major role for AT1b receptor in mouse mesenteric resistance vessels and its distribution in heart and neuroendocrine tissues. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 693–696.

Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., et al. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat. Cell Biol.* 6, 499–506.