



González, Nazareno

Estudio preclínico de nuevos inhibidores de Rac1 en modelos de tumores resistentes



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

González, N. (2018). *Estudio preclínico de nuevos inhibidores de Rac1 en modelos de tumores resistentes.* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2013>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio preclínico de nuevos inhibidores de Rac1 en modelos de tumores resistentes

TESIS DOCTORAL

Nazareno González

gonzalez.nazareno1@gmail.com

Resumen

Durante la realización de este trabajo de investigación nos propusimos llevar adelante la caracterización del papel de la GTPasa Rac1 en los mecanismos moleculares relacionados con la resistencia a terapias endócrinas en cáncer de mama. Para este fin, utilizamos diferentes modelos celulares de cáncer de mama, demostrando que la inhibición de Rac1 logró revertir la resistencia endócrina.

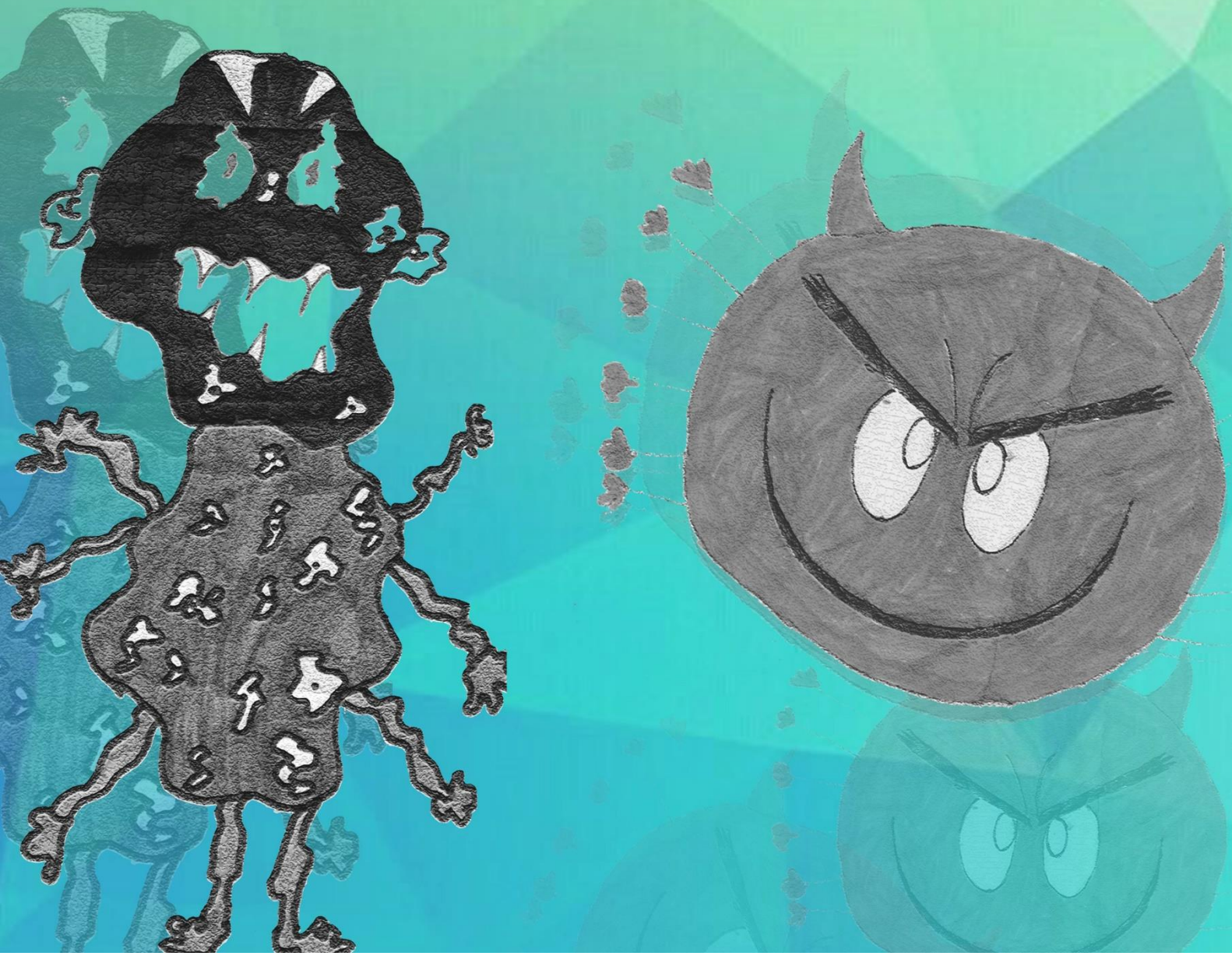
tesis doctoral

ESTUDIO PRECLÍNICO DE NUEVOS INHIBIDORES DE RAC1 EN MODELOS DE TUMORES RESISTENTES

Lic. Nazareno Gonzalez

Director: Dr. Pablo Lorenzano Menna

Co - Director: Dr. Daniel E. Gomez





tesis doctoral

Estudio preclínico de nuevos inhibidores de Rac1 en modelos de tumores resistentes

Autor: Lic. Nazareno Gonzalez

Director: Dr. Pablo Lorenzano Menna

Co-Director: Dr. Daniel E. Gomez

Laboratorio de Oncología Molecular
Departamento de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes

*A mis abuelos Pocho y Nicasio,
que creo que nunca entendieron a qué me dedicaba
pero sé que estarían orgullosos de este logro*

*A la educación pública,
por haber permitido que “caiga” en ella
desde el Jardín de infantes*

La idea del diseño de tapa fue de mi amiga Mari. Los dibujos los hicieron mis sobrinas Cande y Luna, intentando plasmar en un papel lo que se imaginan cuando se habla de cáncer. El diseño de la tapa estuvo a cargo de mi amiga Flor. A continuación transcribo de forma textual la explicación que cada una me dio sobre sus dibujos:



Cande (10):

“Es un monstruo, tipo germen, pero más grande. Que se te entra al cuerpo. Con todos los ojos ve lo que tiene que agarrar y lo agarra con muchos brazos. Cuando tomas el remedio, él ve si eso lo tiene que comer o no, para que no lo mate. Por eso tiene muchos ojos y muchos brazos.”

Luna (8):

“La cara de malo es como que te puedes morir y eso. Y las manos es como que te agarra y se te pone todo en la piel y te quedas todo pelado”



Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral formaron parte de las siguientes:

Publicaciones en revistas científicas internacionales con referato

- **2018:** *Relevance of small GTPase Rac1 pathway in drug and radio-resistance mechanisms: opportunities in cancer therapeutics (Review)*. Cardama GA, Alonso DF, **Gonzalez N**, Maggio J, Gomez DE, Rolfo C, Lorenzano Menna P. *Critical Reviews in Oncology-Hematology*, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.01.012>
- **2017:** *Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review)*. Cardama, G.A., **GONZALEZ, N.**, Maggio, J., Menna, P.L., & Gomez, D.E. (2017). *International Journal of Oncology*, 51, 1025-1034. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4093>
- **2017:** *RHO GTPasas como blancos moleculares en cáncer. Estrategias y oportunidades terapéuticas*. JULIÁN MAGGIO, **NAZARENO GONZÁLEZ**, GEORGINA A. CARDAMA, DANIEL E. GOMEZ. *MEDICINA (B. AIRES) VOL.77 NO.6 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES DIC. 2017*
- **2017:** *Pharmacological inhibition of Rac1-PAK1 axis restores tamoxifen sensitivity in human resistant breast cancer cells*. **GONZALEZ N**, Cardama GA, Comin MJ, Segatori VI, Pifano M, Alonso DF, Gomez DE, Menna LP. *Cell Signal*. 2017 Jan;30:154-161. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.12.002. Epub 2016 Dec 7.
- **2014:** *Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines*. Cardama GA, Comin MJ, Hornos L, **GONZALEZ N**, Defelipe L, Turjanski AG, Alonso DF, Gomez DE, Menna LP. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014;14(6):840-51.

Congresos Internacionales

- **2015:** *"Development of an hormone independent and tamoxifen resistant breast cancer cell model by Rac1 upregulation activity"* **GONZALEZ N**, Cardama GA, Alonso DF, Gomez DE, Lorenzano Menna P. *SISTAM 2015-The Third Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine*, Abril 1-6 2015, Bariloche, Argentina
- **2014:** *Design and Synthesis of Rac1 inhibitors as Potential Antitumor Agents* Ciarlantini, M.; **GONZALEZ, N.**; Defelipe, L., Gandolfi Donadio, L.; Turjanski, A.; Lorenzano Menna, P.; Comin, M. J. *The 7th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (BrazMedChem2014)*. 9 -12 November 2014, Campos do Jordão, Brasil.
- **2013:** *Synthesis and development of novel small molecules targeting Rac1 signaling as new potential leads for antitumor agents*. Ciarlantini, M.; **GONZALEZ, N.**; Cardama, G. A.; Defelipe, L.; Turjanski, A.; Alonso, D. F.; Gomez, D. E.; Lorenzano Menna, P.; Comin, M. J. *15th Brazilian Meeting on Organic Synthesis*, 10 al 13 Noviembre de 2013, Campos do Jordão, Brasil.
- **2013:** *"Novel Rac1-GEF inhibitors as anticancer agents for aggressive tumors"* Cardama G.A., **GONZALEZ N.**, Comin M.J., Turjanski A.G., Alonso D.F., Gomez D.E., Lorenzano Menna P. *AACR Annual Meeting 2013 "Personalizing Cancer Care Through Discovery Science"*. 6 al 10 de Abril; Washington, DC; Estados Unidos

Congresos Nacionales

- **2017:** “*Pharmacodynamic and site-directed mutagenesis study of the interaction of 1A-116 with the GTPase Rac1*”. **NAZARENO GONZALEZ**, Georgina A. Cardama, Julián Maggio, Javier Robles-Valero, Sonia Rodríguez-Fdez, Daniel E. Gomez, Pablo Lorenzano Menna. . Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. 62° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 13 al 17 de Noviembre, Buenos Aires, Argentina.
- **2016:** “*Pharmacological inhibition of Rac1-PAK1 axis restores tamoxifen sensitivity in human resistant breast cancer cells*” **GONZALEZ N**, Cardama GA, Comin MJ, Segatori VI, Pifano M, Alonso DF, Gomez DE, Menna LP. 61° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 16 al 19 de Noviembre, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- **2014:** “*Desarrollo de un modelo de carcinoma mamario humano hormono-independiente y resistente a Tamoxifeno, por sobreactivación de la GTPasa Rac1*” **NAZARENO GONZÁLEZ**; Georgina Cardama; Daniel F. Alonso; Daniel E. Gomez; Pablo Lorenzano Menna. 59° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 19 al 22 de Noviembre, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- **2013:** “*Propiedades Anti-metastásicas de un nuevo inhibidor de la GTPasa Rac1 obtenido por diseño racional*”. **GONZÁLEZ N.**; Cardama G.; Comin M.; Alonso D.; Gómez D.; Lorenzano Menna P. 58° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 20 al 23 de Noviembre, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- **2013:** “*Diseño racional de nuevos inhibidores de la GTPasa RAC 1 con actividad antimetastásica en cáncer mamario*”. Pablo Lorenzano Menna; Georgina A. Cardama; **NAZARENO GONZÁLEZ**; María J. Comin; Adrián Turjanski; Daniel F. Alonso; Daniel E. Gómez. 58° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 20 al 23 de Noviembre, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- **2013:** “*Diseño y síntesis de moléculas pequeñas. Desarrollo de agentes antitumorales*” Comin, M.J.; Garcia, C.L.; Ciurlantini, M.; Gandolfi Donadio, L.; Hornos, L.; Cardama, G.; Lorenzano Menna, P.; **GONZALEZ, N.**; Alonso, D. F.; Gomez, D. E.; Defelipe, L.; Turjanski, A.G.; Blumberg, P.M. 11° Jornadas Abiertas de DESARROLLO, INNOVACIÓN y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - TecnoINTI Edición 2013 - 2 al 4 de Julio 2013

INDICE

AGRADECIMIENTOS	17
INTRODUCCION	29
Cáncer de mama	31
Factores de riesgo	31
Clasificación del cáncer de mama	34
Receptor de estrógenos	38
Tratamientos	42
Bases de datos de perfiles de expresión génica	47
Clases de biomarcadores	48
Cáncer de mama ER positivo.....	53
Tamoxifeno	53
Inhibidores de Aromatasa	54
Mecanismos de resistencia a terapias endócrinas	55
Clasificación	55
Resistencia adquirida a SERMs.....	56
Resistencia adquirida a IAs.....	58
Estrategias terapéuticas para revertir resistencia endócrina	59
Desarrollo de inhibidores de proteínas de señalización.....	60
Diseño racional de inhibidores de Rac1	63
Rac1 como blanco terapéutico en resistencia endócrina.....	65
OBJETIVOS	67
Objetivo General.....	69
Objetivos específicos	69
MATERIALES Y METODOS	71
Líneas celulares utilizadas	73
Drogas.....	73
Ensayos reporteros de luciferasa	74
Generación de mutantes puntuales de Rac1 y Cdc42 mediante mutagénesis dirigida.....	74
Determinación de los niveles de Rac1 activo (<i>Pull-Down assay</i>).....	75
Cultivo 3D de queratinocitos humanos	76
Inmunofluorescencia y tñido con hematoxilina y eosina	76
Western Blot	77
Análisis de bases de datos de expresión génica	77
Determinación del tiempo de duplicación de los modelos MCF7	78
Ensayos de migración en herida.....	78

Ensayos de proliferación celular	78
Fraccionamiento sub-celular para evaluar translocación citosol-núcleo de PAK1	79
Determinación de los niveles de fosforilación del ER por citometría de flujo	79
Ensayos <i>in vivo</i>	79
Análisis estadístico	80
RESULTADOS	81
CAPITULO I - Estudio farmacodinámico y de mutagénesis dirigida de la interacción de 1A-116 con la GTPasa Rac1	83
1A-116 inhibe la activación de SRE mediada por diferentes GEFs	87
1A-116 inhibe la activación de SRE mediada por Rac1/RhoA-G	87
El residuo aminoacídico W56 de Rac1 es necesario para los efectos inhibitorios de 1A-116	89
1A-116 actúa inhibiendo la actividad de Rac1 a nivel GEFs-Rac1	90
1A-116 inhibe la formación de ruffles y lamelipodios	93
Discusión Parcial – Capítulo I	95
Conclusiones Parciales – Capítulo I	103
CAPITULO II - Análisis de los perfiles de expresión génica de la vía de señalización de Rac1 en muestras de pacientes de cáncer de mama	107
Análisis de la expresión génica de diferentes componentes de la vía de señalización de Rac1 en muestras de pacientes de cáncer de mama	111
Asociación entre la expresión de genes de la vía de Rac1 y la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama	114
La expresión de genes de la vía de Rac1 como potenciales marcadores de respuesta al tratamiento endócrino	117
Discusión Parcial – Capítulo II	123
Conclusiones Parciales – Capítulo II	131
CAPITULO III - El rol de GTPasa Rac1 como componente importante en el desarrollo de resistencia endócrina	135
CAPITULO III A - Implicancias de Rac1 en el desarrollo de resistencia a Inhibidores de Aromatasa	139
ERK1/2 se encuentra sobreactivada en un modelo celular de resistencia a IAs	141
1A-116 devuelve la sensibilidad a IAs en células resistentes MCF7-LTED	141
Conclusiones Parciales - Capítulo III A	145
CAPITULO III B - Implicancias de Rac1 en el desarrollo de resistencia a Tamoxifeno	149
Desarrollo de un modelo celular de cáncer de mama humano con sobreactivación de Rac1 ..	151
La sobreactivación de Rac1 provoca un fenotipo hormono-independiente en células de cáncer de mama humano	152
La inhibición de Rac1 restablece la sensibilidad a Tam en células resistentes	153
La inhibición de la vía de señalización Rac1-PAK1 revierte los mecanismos de resistencia de Tam	

en células de cáncer de mama resistentes.....	154
La sobreactivación de Rac1 promueve un fenotipo altamente agresivo, incrementando la capacidad tumorigénica de células de cáncer de mama humano MCF7.....	158
1A-116 tiene efecto anti-tumoral en un modelo de cáncer de mama con resistencia endócrina intrínseca	159
Conclusiones Parciales – Capítulo III B	163
Discusión Parcial - Capítulo III A-B.....	167
CONCLUSIONES FINALES.....	177
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	183
BIBLIOGRAFIA	187

AGRADECIMIENTOS

El resultado de este trabajo doctoral no hubiese sido tal sin la ayuda de innumerables personas. Lo dije una vez y lo vuelvo a repetir: escribir los agradecimientos es algo que disfruto muchísimo. Tengo palabras de agradecimiento para mucha gente así que voy a empezar por grupo de inhibidores de Rac1: Pablo, Daniel, Georgi, Juli. Mi equipo de trabajo dentro del Laboratorio de Oncología Molecular de la UNQ:

A Pablo, mi jefe, mi guía y referente científico y con el que terminamos forjando una amistad muy sincera. El “gracias” que tengo para darte queda chico. Primero por haber confiado en mí desde que entré al laboratorio, dándome libertad para que me forme y libere mi potencial sin restricción alguna. Fuiste el jefe que cualquier científico quisiera tener, porque fuiste jefe sin serlo. Fuiste un compañero más en el día a día, con el que compartí esa pasión por el trabajo en equipo y un proyecto compartido. Tuvimos momentos de encontronazos pero siempre decidimos ir en una dirección en común, haciéndonos cargo de nuestros pasos. Fuiste consejero de vida en mis momentos oscuros y de mal humor, y me motivaste a ponerme la camiseta de este proyecto, dejando de lado los egos y trabajando de la forma que más nos gusta hacerlo: en equipo y disfrutando muchísimo del día a día. Me pone muy feliz ver lo que hemos logrado y tengo muchísima expectativa por lo que vendrá. No tengo dudas de que vamos a volver a encontrarnos, trabajando codo a codo.

A Daniel Gomez, mi co-director de tesis y director de beca, gracias por haberme permitido entrar a este grupo de trabajo excepcional, por todas tus enseñanzas y las oportunidades que me regalaste durante todo este viaje. Hubo momentos en los que estuvimos más cerca, otros en los que no... pero siempre estuviste pendiente de mis cosas, tanto científicas como personales. Gracias por tus clases de diplomacia y estrategias bélicas, y por ponerme plazos para cumplir con los objetivos.

A Georgi, mi hermana de proyecto, una científica con un empuje y una capacidad de trabajo increíble. Gracias por la paciencia infinita que me tuviste desde el primer día. A pesar de ser diferentes, aprendimos a trabajar a la par, teniendo un objetivo en común muy claro. Siempre estuviste dispuesta a ayudarme en lo que necesitaba y fuiste mi docente en muchas de las cosas que aprendí. Gracias por guardar el secreto de cómo aprendí a repicar! Estoy orgulloso de todos tus aportes al proyecto y al grupo en general. Mil gracias por tu inglés, por ponerte al hombro la escritura de varios papers y ayudarme con el “mío” (el pronombre va solo por el orden de autorías, jaja). Gracias también por encargarte de los subsidios! Fue un gran honor trabajar a tu lado!

A Juli, la última “adquisición” del grupo Rac1, muchísimas gracias por tus figuras y tu predisposición constante. Por cuestiones de viajes, cursadas, clases y escritura compartí menos tiempo que con los demás, pero siempre estuviste dispuesto a darme una mano en lo

que necesitaba y te mostraste siempre interesado en mis resultados. Toda la suerte para vos en este comienzo de doctorado!

Para cerrar con el grupo Rac1, quiero que sepan que para mi ha sido un honor poder trabajar en este proyecto. Quizás todavía no caigamos de lo que logramos, pero 1A-116 nació en lo que en ese momento parecía ciencia ficción. Logró salir de la pantalla de una computadora, atravesar toda la etapa pre-clínica y hoy estar en las puertas de un fase I. Es un orgullo gigante el que siento cada vez que hablo de 1A (como le decimos todos los días). Y esto se debe a que es el resultado de un trabajo en equipo. No hay otra. Las cosas se logran así: trabajando en grupo, apoyándose los unos a los otros y ocupando el lugar que cada uno debe ocupar, sin descuidar el conjunto. Dejo el proyecto en un momento hermoso y con nuevos desafíos pero feliz de haber aportado mi granito de arena para que lo que hicimos en la mesada llegue a la cama de un paciente. Más no puedo pedir!

Voy a seguir con “los de arriba”... En primer lugar a Daniel Alonso, por haberme permitido entrar a este grupo y por todas tus enseñanzas médicas y científicas. Fueron claves a la hora de incentivarme a buscarle la vuelta a resultados raros, que no tenían mucho sentido o que simplemente era difíciles de explicar/entender. Gracias por darme la oportunidad de superarme día a día.

A Gi, por estar siempre lista para ayudarme, por tener siempre un ratito para enseñarme cosas nuevas. Gracias por tu humildad y por preocuparte día a día por mis cosas. Gracias por tu alegría sincera por mi logros.

A Hernan, (con acento en la E y no en la A), por tus charlas científicas y deportivas, tus locuras de congresos y por ese abrazo que me diste cuando te enteraste que me iba. Fue genial tenerte de compañero. Gracias por valorarme siempre! A Marian, por brindarme la oportunidad de pararme frente a un aula llena de alumnos. Gracias por tus preguntas y comentarios en cada seminario, que no solo lograron mejorar mi trabajo, sino que me hicieron crecer como científico. A ambos, gracias por tratarme como uno más!

Voy a seguir con “los de abajo”, los que estuvieron día a día, codo a codo durante todo este trabajo:

A Mari, mi amiga del corazón. A lo largo de estos años formamos una amistad tan linda que lo que diga acá no es novedad. Agradezco de corazón todo lo mucho que me ayudaste durante este trabajo. Fuiste un pilar fundamental en los momentos de catarsis y muchos de los resultados de este trabajo tienen tu impronta. Me pone muy feliz compartir con vos nuestra pasión por la ciencia y el trabajo en equipo. Admiro enormemente tu vocación, dedicación, inteligencia y humildad... siempre digo que para mí es un orgullo gigante poder

tenerte de amiga y compañera de trabajo. No solo fuiste la mejor profesora de estadística que cualquiera quisiera tener, sino que tu capacidad científica hizo que todos nuestros trabajos mejoren después de recibir un comentario tuyo. Voy a extrañar muchísimo nuestros viajes en tren, nuestras charlas interminables y mis ataques de alergia peronista. Pero de algo estoy seguro: aunque nos separemos 1000 días, el reencuentro será como si el tiempo no hubiese pasado. Te quiero con el alma!

A Vale, otra amiga que me regaló la ciencia. Agradezco enormemente haberte tenido siempre cerca en mis momentos de locuras, catarsis y ganas de revolear todo! Siempre estuviste ahí para bajarme a tierra y contenerme. Gracias por estar siempre dispuesta a darme una mano en lo que necesitaba y por aportar toda tu capacidad para que salieran los resultados del paper. Gracias por pensar en mí para la materia. Gracias también a Nico, por bancarse todas nuestras charlas ñoñas y quejas al sistema. A ambos, por alojarme siempre que me quedaba en Bernal.

A Carli, la persona más divertida y con la que más me río. La que entiende mis chistes al toque y festeja los que son muy malos. Otra amiga de la ciencia. Gracias infinitas por tu humildad y sencillez y nuestras charlas delirantes. Gracias por tener siempre una palabra de aliento cuando notabas algo raro y por tu preocupación constante.

A las 3: Gracias por ser las *outliers* más lindas del mundo!

A Juan, mi amigo de aventuras de congresos, el que nunca te deja tirado, el que te banca con los Valmont y que siempre tiene un chiste para hacerte reír. Un gracias enorme por tu inteligencia y tu capacidad de laburo. Y por preocuparte siempre por mi trabajo. Algún día, cuando sea grande, quiero ser como vos! Te espero por allá cuando quieras...si no te dejan, yo saco permiso.

A Romi, la persona con más títulos de la Argentina: aparte de ser una excelente biotecnóloga, es: especialista en cosas, lic. en administración de subsidios, técnica en protección animal, magister en repostería, diariera, docente, creadora de grupos de whatsapp, cadete de mensajería a posgrado y guía turística (a pesar de que te faltó cursar "Cálculo de distancias a lugares", para mí ya lo sos). Nunca vi a una persona tan predispuesta a ayudar al otro. Te sale de forma natural y con una humildad increíble. Gracias por toda tu ayuda durante mi doctorado, en especial en este último tramo donde mis protestas ante la edición se volvieron constantes. Gracias por preservar mi título como lo hiciste y por demostrarnos con lágrimas todo lo sensible que sos. Voy a extrañar muchísimo tus bailes y tus chapes "accidentales" (todos sabemos cómo fue).

A Maru, por compartir conmigo los arranques de puteadas y gritos. Por ponerte al

hombro nuestras broncas ante el mal manejo de equipos, listas de reservas o injusticias laboratoriles. Admiro tu capacidad de trabajo y tu pensamiento lateral. Pero más admiro que nunca dejas de intentar cosas nuevas para sacar adelante ese doctorado. Te tocó bailar con una difícil y lo estás haciendo de maravillas. Mil gracias por tu ayuda y sugerencias cuando el anticuerpo del infierno no marcaba ni poniéndolo puro.

A Cyn, por tu curiosidad y predisposición constante para ayudar a la gente, por todos tus aportes al laboratorio (fueron enormes!) y por preocuparte por entender cada uno de mis ensayos. Gracias por ayudarme con las citometrías y los gráficos, por alegrarte cuando salían y por frustrarte conmigo cuando no. Por tus millones de cartelitos pegados por todas las paredes de los 3 laboratorios, por tus mensajes de enojo al whatsapp y por ser una fuente inagotable de noticias del espectáculo. Sos buena gente y espero de corazón que se te dé lo que realmente mereces.

A Diego, el pelado extranjero que era de LOM antes de que entrara. Mil gracias por todos tus consejos, tus ayudas informáticas y de western. Gracias por alegrarte sinceramente por cada uno de mis logros y preocuparte por mis tropiezos. Gracias también por todos los asados, en especial por ese en el que casi perdes el trabajo!

A Héc, por tu ayuda con las citometrías y por las decenas de tortas y cosas dulces que trajiste al labo. Gracias por estar siempre pendiente de mis estados de ánimo. Muchísimos éxitos en este desafío que se te viene. No tengo dudas de que la vas a gastar!

A Joy, por permitirme dudar de la integridad de tu lóbulo frontal. Sos la persona con menos filtro del mundo (o con el poro de filtro más grande del mundo, habría que verlo) y eso te hace muy especial. Disfruté muchísimo de tus rabietas y fue un placer hablar con vos cuando las cosas no salían, porque siempre tuviste palabras de aliento. Mil gracias por tu preocupación sincera y por hacernos reír con tus ocurrencias. Ahora, a por el doctorado que capacidad te sobra!

A los Fitos, el agradecimiento va en bloque, porque así se los ve moverse por la UNQ, jajaja. Ro, Nori, Lore y Humber. Muchísimas gracias por toda su ayuda en el último tramo y sus palabras de aliento constantes. Ro, gracias por bancarte mis preguntas inquisitorias sobre.... Bueno, sobre eso. Lore y Nori, mil gracias por todo lo que hacen a diario por el funcionamiento del laboratorio. Humber, gracias por tu preocupación genuina y tu interés en mis logros.

A Flor, la incorporación más reciente de LOM. Compartimos poco tiempo pero enseguida pegamos buena onda. Sé que lo mejor que te pudo haber pasado fue haberme conocido pero bueno, te vas a acostumbrar cuando me vaya, jajaja. Mil gracias por ayudarme

con las fotos y por hacernos reír todo el tiempo. No tengo dudas de que tus aportes van a hacer crecer muchísimo al grupo. Muchísimos éxitos en esta nueva carrera llamada maternidad. Si llora mucho, esperalo... no le des el chupete enseguida.

A Nani, como con Juli, compartimos pocas cosas y reconozco que me costó conectar al principio. A fuerza de chistes y comentarios irónicos, pude sacarte alguna que otra sonrisa. No tengo dudas de que vas a ser una gran científica. Muchos éxitos en lo que viene!

A los Ex-LOM, a Silvi y Ana Torbidoni, por sus chistes, ocurrencias y comentarios alocados. Gracias por la humildad que mostraron siempre y por el cariño sincero que me tienen. Mucha suerte por dónde anden!

A LOM, gracias a todos por estos 7 años maravillosos que me hicieron vivir. Gracias por bancarme de la manera que lo hicieron, por soportar mis locuras, por enseñarme algo nuevo todos los días, por ayudarme a sacar adelante este trabajo. Millones de gracias por ser la razón por la que todos los días me levantaba con ganas de venir a trabajar. Los volví locos todo este tiempo hablándoles del trabajo en equipo y lo importante que era que tiremos todos para el mismo lado. Por favor no se olviden nunca de eso: "El talento gana partidos, pero el trabajo en equipo ganan campeonatos", dijo una vez Michael Jordan. Los voy a extrañar muchísimo y sepan que me van a hacer mucha falta. No tengo dudas de que nos vamos a volver a encontrar, ya sea en una SAIC (espero que sin e-posters y todas esas cosas raras), una cervecería o simplemente por ahí. Espero haber estado a la altura de semejante grupo. Los quiero hasta el cielo ida y vuelta!

A Toti, por ser el creador/conductor del Toti Bus, un transporte público que arrancó disolviendo 3 parejas estables y con un futuro prometedor enorme (Cuac!). Mil gracias por llevarnos y traernos a la UNQ, por los mates y cervezas compartidas (acá y allá), por las charlas de fútbol.

A los Ingeniería, por estar siempre dispuestos a ayudarme. En especial a Marian, que siempre tuvo palabras de aliento y de enseñanzas para conmigo.

A Santi Plano, por ser ese tutor que no molesta. Por interesarse por mis avances y aconsejarme. Por ser co-inventor de nuestra aguja de administración oral con un tip y una gomita. Por problemas de patentes, todavía no podemos darla a conocer.

A Mari Gastaldi y Bruno, por su trabajo silencioso (el de Bruno, claramente) para que podamos trabajar de la mejor manera. A Mari, por sus puteadas y gritos. A Bruno por estar siempre al pie del cañón cuando necesitábamos algo.

A la Fac. de Ciencias Exactas de La Plata, por haberme recibido en mis primeros años

facultativos. Por enseñarme mis primeras bases universitarias. A la UNQ, por permitir que termine mi carrera y por formarme como profesional. A las cátedras de UNAJ y UNQ, por haber confiado en mí para estar al frente de las materias. Me sentí muy cómodo y contenido, a pesar de que muchos de mis alumnos no podían creer que yo fuera el profesor. Fue una experiencia hermosa y aprendí muchísimo. Gracias a la UNQ por haber permitido que devuelva, mediante mis clases, algo de lo mucho que me dieron.

A Ale Zinni, por tus consejos y charlas con mate de por medio. No es para nada fácil dirigir un Departamento en las épocas que corren. Pero vos le estas poniendo el cuerpo para defender nuestro derecho a hacer ciencia.

A lxs chicxs de Posgrado, por solucionarme cada problema, duda o inquietud que tuve durante este doctorado. Por recibirme con una sonrisa cada vez que abría esa puerta y aceptar siempre mis facturas a modo de recompensa.

A Xosé, un gracias enorme por haberme permitido entrar a un grupo de excelencia, por haberme dado vía libre para que pruebe cuanta cosa, equipo o reactivo había en el laboratorio, por todas las enseñanzas que aprendí en tan poco tiempo, por tus retos (reñidas en español español) y tus conversaciones en gallego. Llegué a Salamanca siendo una persona y volví siendo una bastante diferente, más maduro y seguro de lo que quería. Una parte muy importante de esta tesis se debe a mi paso por el Lab 2 del Centro de Investigaciones del Cáncer y eso nunca voy a dejar de agradecértelo. Muchísimas gracias por haber intentado de muchas formas que vuelva y estar pendiente del proceso de escritura de mi tesis. Las becas no salieron pero no tengo dudas de que vamos a volver a encontrarnos. Gracias, de corazón!

A los Bustelinos, por ser ese grupo increíble que me recibió con los brazos abiertos desde el primer día que llegué a Salamanca (a excepción de Sonia que ni siquiera me saludó, pero bueno). Si logré tantos resultados fue porque tuve la ayuda de todos ustedes. Cada uno desde su lugar colaboró para que esta tesis salga adelante y la sintieron propia. A Rubén, por ser ese gallego loco que siempre estaba de buen humor, por ayudarme tanto con las bases, por compartir la mesada y por estar siempre pendiente de mis cosas. A Javi R, por haberme ayudado con las células de pacientes y junto con Sonia (la del 2), por haberme enseñado todo sobre las luciferasas. A Jesús, por tu predisposición constante, tus chistes malos y ser el guía turístico más gracioso de Granada. Un gracias gigante por lo que hiciste para que salga la Marie Curie. Gestos como esos hablan de una persona con un corazón enorme y siempre voy a estar agradecido. A Laura, gracias por tus risas, tus chistes y tu humildad. Compartimos poco tiempo juntos pero siempre estuviste ahí, preocupada por mis cosas y por salir de fiesta, jaja. A Sonia (la del 3), gracias por ser esa persona tan distraída que siempre

andaba seria por la vida. Pasaron varios meses hasta que te diste cuenta que había un argentino en el laboratorio, gracias por las charlas pre-seminario, por preocuparte por mis cosas y por los bailes granadinos. A Blanca, por tus caprichos, tu corazón gigante y bancarte mis gritos de la mañana granadina. A Fran por tu ayuda con los cultivos 3D (el resultado más lindo de mi tesis) por tus charlas sobre cine argentino y por estar siempre pendiente de mis cosas. A Antonio y Javi C, por toda su ayuda con los animales. Antonio, gracias por tus consejos de vida esa tarde en la guardia del hospital. A Maite, por permitir que te salude con beso (1 vez por semana), por ser una parte fundamental de ese laboratorio, por ayudarme en cuanto duda tenía y recomendarme fechas de compra de ropa. A Myriam, por tus consejos, tus deseos de que vuelva y tu humildad. A Maribel, gracias por ser compañeros de mesada, por tu ayuda con los western y por haberme presentado al Iblot, un ser maravilloso del que volví totalmente enamorado. A Mercedes, por tus palabras de aliento cuando las cosas se pusieron feas, por tus comentarios de seminario y por haberme mandado ese mail tan lindo cuando me volvía. A todos, mil gracias de corazón! Se los extraña muchísimo!

A Juli, JPG o simplemente J, por ser la persona que me inculcó el amor por la ciencia y me dio vía libre para que desarrolle mi potencial. Por estar siempre dispuesta a escribir una carta de recomendación y por todas tus enseñanzas de vida. A todos los R3, por cómo me recibieron y todas las cosas que aprendí.

Al Instituto Nacional del Cáncer, por la beca que me permitió empalmar mi doctorado. A la Fundación Bunge y Born, por haberme permitido realizar la estancia en Salamanca. Gran parte de esta tesis se debió a esa oportunidad. A ambos, gracias por el apoyo que le dan a la investigación oncológica.

A mis amigos: Ger, Lucho, Rose, Nacho, Gato, Vasco, Fefe x 2, Mati, Juli, David, Pancho, Franco, Nano, Cave, Marquitos. Gracias por bancarme como lo hacen, por ser mi cable a tierra cuando las cosas no funcionan y por esas charlas interminables. Gracias por las salidas incansables y las noches de boliche. Gracias a la banda de los jueves de asado, un ritual semanal que logró unirnos aún más. A Ger, por ser esa persona extremadamente colgada que siempre tiene un consejo para darte, que refuerza todo el tiempo mi rol de científico y por alegrarte de corazón por todos mis logros. Gracias de corazón por tu amistad sincera! A Lucho, por ser ese hermano que me dio la vida. A Rose, por los años de convivencia, por las charlas post-cena, por bancarte mi mal humor cuando volvía de Zárate y por tus enseñanzas de levante en las redes sociales. A Nacho, por elegirnos a pesar de la distancia, por enseñarme que lo que vale es la calidad y no la cantidad y por tener siempre un consejo listo para darme. Te extraño grandote! A Gato, por haberme incentivado a hacer la locura más grande que hice hasta ahora, por pensar siempre un plan B por si no salía la

beca y por ser un ejemplo de perseverancia. A todos, gracias por estar a mi lado desde hace tanto tiempo!

A Flor, mil gracias por tu ayuda con la tapa. La gastaste!

A mi familia, pilar fundamental en mi vida. A mis viejos por todo lo que hicieron y hacen para que logre mis objetivos. Por haberme criado, educado y formado con unos valores increíbles, por enseñarme el valor del trabajo y la humildad y recalcarme que sin eso no se llega a ningún lado. Gracias por haber apoyado cada una de mis decisiones, por la confianza que me tienen y por amarme como lo hacen. A mis hermanos Marisol, Juli y Pato, por todos estos años compartidos, que incluyen millones de risas, peleas y abrazos. A Marisol, por el orgullo que siento cuando me hablan de vos, por ser ejemplo de humildad y vocación. A Juli, por haber permitido que la vida nos dé otra oportunidad. A ambas, gracias infinitas por haberme regalado el título más importante que tengo: ser tío de 4 personitas geniales, Cande, Luni, Regi y Celes. A quienes extraño muchísimo todos los días y me alegran el corazón cuando los veo. A Cande y Luna por su arte para la tapa. A Pato, por ser mi hermano futbolero y compañero de salidas. Por tu corazón enorme y por compartir esos arranques de furia tan repentinos. Muchísimos éxitos en lo que se viene, la vas a gastar!

A mis primos, por nuestra amistad y complicidad. A Pauli porque más que una prima es una hermana; a Rayo y Juli, por nuestros chistes cómplices, nuestras citas constantes de Los Simpsons y por hacerme reír como lo hacen. A mis tíos y abuelos, por formar parte de una familia maravillosa, que supo pasar momentos muy difíciles pero que siempre se mantuvo unida para salir adelante. A mi abuelo Pocho, por esas enseñanzas sin hablar y esos ejemplos de trabajo y humildad. Voy a lamentar muchísimo no tenerte conmigo el día de la defensa. Te extraño horrores y, a pesar de que estabas feliz por mi oportunidad en España, voy a necesitar siempre ese abrazo que me faltó darte. Desde dónde estés, sé que estarás conmigo.

Quiero terminar haciendo un agradecimiento simbólico pero no por eso menos valedero, sino todo lo contrario. Quiero agradecer a la educación pública, por haberme formado de la manera que lo hizo. En tiempos en los que se intenta bastardear el derecho a tener una educación pública y gratuita, yo siento un orgullo increíble de tener la suerte de haber recorrido todos sus escalones. Jardín, primaria, secundaria, universidad y posgrado. A CONICET, por ser esa institución que promueve incansablemente la ciencia y la tecnología en nuestro país, y que hoy en día está sufriendo los embates de esta nueva-vieja política. Gracias por la oportunidad que me brindaron de realizar un doctorado. A la sociedad toda, quienes con sus impuestos colaboran para que podamos seguir investigando, les pido que luchemos por mantener estos derechos y no permitamos que nadie se atreva a ningunearlos. Defendamos la ciencia argentina y valoremos todo lo mucho que los científicos tenemos para

aportar. Un país sin ciencia, es un país sin desarrollo y así, nunca vamos a poder salir adelante.

#noalrecorteenciaytecnología

#noalrecorteeducación

A todos y cada uno de los que recorrieron este viaje conmigo, mil gracias! Sepan que estoy inmensamente feliz y satisfecho con lo que pudimos hacer. Hasta luego!

INTRODUCCION

Cáncer de mama

El término “cáncer” hace referencia a un grupo de enfermedades caracterizadas principalmente por presentar fallos en los mecanismos de regulación de la proliferación e invadir tejidos sanos circundantes. Es la segunda causa de muerte a nivel mundial entre las enfermedades no transmisibles. En nuestro país mueren por esta patología aproximadamente 5600 personas por año (con 19,9 defunciones cada 100.000 mujeres) y, según estimaciones para el año 2012 realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*, por sus siglas en inglés), la incidencia se encontraba en valores correspondientes a países con incidencia media-alta (172.3-242.9 cada 100.000 habitantes) (1).

Entre los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de mama es el segundo tipo más común a nivel mundial (superado sólo por el cáncer de pulmón) y, por lejos, el más frecuente entre mujeres. Solo el 1% de los cánceres de mama se presentan en hombres. Es una enfermedad originada principalmente en células epiteliales que revisten los conductos y lóbulos de la mama, que puede existir como enfermedad no invasiva durante largos períodos de tiempo.

Factores de riesgo

A pesar de que no existen resultados contundentes que permitan explicar la etiología del cáncer de mama, algunas características o factores de riesgo aumentan la probabilidad de que una persona desarrolle la enfermedad (2):

- Edad: el riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta con la edad, siendo extremadamente raro en menores de 20 años pero muy común en mayores de 55 años.
- Raza: las personas de raza blanca son, en promedio, más propensas a desarrollar cáncer de mama en comparación con personas de raza negra. Sin embargo, éstas últimas son más susceptibles de morir por esta patología.
- Estilo de vida: ciertos tipos de cáncer de mama están relacionados a comportamientos personales como la dieta o la realización de ejercicio. El consumo excesivo de alcohol está directamente relacionado al desarrollo de cáncer de mama (y de otros tipos de cáncer). Las mujeres con sobrepeso tienden a presentar niveles de insulina en sangre más elevados que se asocian a algunos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de mama. El sedentarismo y el hábito de fumar activa o pasivamente también aumentan el riesgo de contraer la enfermedad, principalmente entre la menarca y el primer embarazo a término.

- Factores hormonales:
 - Comienzo temprano menarca/finalización tardía de menopausia: mujeres que hayan tenido más ciclos menstruales, ya sea por un comienzo temprano o una finalización tardía de la menstruación, tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.
 - Gravidez: Las mujeres que no han tenido hijos o aquellas que tuvieron su primer hijo después de los 30 años tienen en general un riesgo ligeramente mayor de padecer cáncer de mama. Los embarazos múltiples y quedar embarazada a una edad temprana reducen el riesgo de cáncer de mama en general. Aun así, el efecto del embarazo es diferente para los distintos tipos de cáncer de mama. Para el cáncer de mama triple negativo, el embarazo parece aumentar el riesgo.
 - Hormonas exógenas: la utilización de terapia de reemplazo hormonal o el consumo de anticonceptivos puede aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad. En cambio, la lactancia podría ser beneficiosa, ya que se ha visto una reducción en el riesgo de contraer la enfermedad en mujeres que han amamantado a sus bebés por más de 1 año. La explicación para este posible efecto puede ser que la lactancia reduce el número total de ciclos menstruales en la vida de una mujer (lo mismo que comenzar los periodos menstruales a una edad mayor o experimentar una menopausia temprana).
- Predisposición genética:

Entre un 5% y un 10% de los casos de cáncer de mama tienen una relación directa con mutaciones en la línea germinal. Existen varios genes que participan en los casos familiares:

BRCA1 y *BRCA2*: la causa más común de cáncer de mama hereditario es una mutación en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. En las células normales, estos genes ayudan a prevenir el cáncer al producir proteínas que ayudan a evitar el crecimiento anormal de las células. Las versiones mutantes de estos genes no pueden detener el crecimiento anormal y pueden ocasionar cáncer. En algunas familias con mutaciones *BRCA1*, el riesgo de padecer cáncer de mama durante la vida es tan alto como 80%, pero en promedio este riesgo parece estar entre 55% a 65%. Para las mutaciones *BRCA2*, el riesgo es menor, alrededor de 45%. Las mujeres con estas mutaciones hereditarias también tienen un mayor riesgo de padecer otros tipos de cánceres, principalmente cáncer de ovario. En la actualidad, estas mutaciones pueden detectarse con

facilidad, por lo que mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama deberían, siempre que sea posible, recibir asesoramiento genético para evaluar las posibilidades de prevención disponibles, según el tipo de tumor, la edad del paciente y los riesgos que presente. Aunque las pruebas pueden ser útiles en algunos casos, se deben considerar cuidadosamente las ventajas y las desventajas.

Otras mutaciones genéticas podrían también conducir a cánceres de mama hereditarios, aunque son menos frecuentes y de menor impacto fisiopatológico que los genes *BRCA*. Estos son: *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11* y *PALB2*.

○ Antecedentes personales de cáncer de mama:

Una mujer con cáncer en una mama tiene un mayor riesgo de padecer un nuevo cáncer en la otra mama o en otra parte del mismo seno (esto es diferente a la recurrencia del primer cáncer). Este riesgo es aún mayor para las mujeres jóvenes con cáncer de mama.

○ Características del tejido mamario:

Las mamas están formadas por tejido adiposo, fibroso y glandular. Se dice que una mujer tiene mamas densas (en un mamograma) cuando tiene más tejido glandular y fibroso, y menos tejido adiposo. Las mujeres cuyas mamas aparecen densas en los mamogramas tienen un riesgo de padecer cáncer de mama de 1,2 a 2 veces mayor que las mujeres con una densidad promedio en sus senos.

○ Exposición previa a quimioterapia y/o radiación:

Las mujeres que siendo niñas o jóvenes fueron tratadas con quimioterapia y/o radioterapia en el tórax para otro tipo de cáncer (como la enfermedad de Hodgkin o el linfoma no Hodgkin) tienen un riesgo significativamente mayor de padecer cáncer de mama.

Los principales factores de riesgo descritos para cáncer de mama se muestran en la Tabla 1

Tabla 1: Factores de riesgo asociados a cáncer de mama

Factores de riesgo no-modificables	Factores de riesgo modificables
Edad mayor a 55 años	Peso corporal, alto consumo de grasas, índice de masa corporal mayor a 35
Historial familiar de cáncer	Actividad física
Edad primera menarca	Consumo de alcohol
Edad inicio menopausia	Condición de fumador
Densidad mamaria	Consumo de anticonceptivos como progestina, utilización de terapia de reemplazo hormonal por más de 10 años
	Exposición a radiación

Clasificación del cáncer de mama

En los últimos años, la mortalidad por cáncer de mama ha sufrido un descenso significativo debido, en gran parte, a los avances en los tratamientos y en las técnicas de detección temprana. La clasificación y estratificación más precisa en mujeres también ha sido de gran importancia, pudiendo categorizar a los pacientes de acuerdo a diferentes parámetros y características.

- Grado:

Basado en cuánto se parece la biopsia al tejido mamario normal y cuán rápido se están dividiendo las células se aplica el *Score* de Nottingham o de Bloom y Richardson modificado. Se analiza la formación de túbulos, pleomorfismo nuclear y recuento mitótico. La utilización del grado del cáncer de mama puede aportar información sobre el pronóstico del paciente y sugerir un tipo de tratamiento. Puede ser clasificado en:

- Grado 1 o bien diferenciado
- Grado 2 o moderadamente diferenciado
- Grado 3 o indiferenciado

En general, tumores de grado bajo indican tasas bajas de proliferación, baja posibilidad de diseminación y mejores probabilidades de supervivencia. Además, pueden ser tratados de manera menos agresiva. En cambio, los tumores de grado alto indican altas tasas de proliferación, siendo más propensos a diseminarse. Tienen peores expectativas de supervivencia y requieren tratamientos más agresivos.

- Estadio:

Hace unos 15 años la *International Union Against Cancer (UICC)* y la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* unificaron sus sistemas de clasificaciones creando un único sistema TNM. Además de permitir un pronóstico más preciso, la clasificación TNM puede determinar la elección del tratamiento. Se basa en:

- Determinar el tamaño del tumor (T),
- Evaluar si el tumor ha alcanzado los ganglios linfáticos (N, de *nodes* en inglés)
- Evaluar la presencia de metástasis (M).

El rango de clasificación va de 0 (cero) a IV, abarcando varios tipos tumorales que van desde cáncer de mama no invasivo e invasivo temprano, a localmente avanzado y metastásico. La clasificación TNM es revisada periódicamente debido a los avances en las técnicas de detección por imágenes, la evolución de los tratamientos y su impacto en la supervivencia. La octava edición del sistema de estratificación TNM entró en efecto el 1 de Enero de 2018, e incluye no sólo la extensión anatómica de la enfermedad, sino también marcadores pronósticos (3).

- Clasificación histopatológica:

El tejido mamario está conformado por lóbulos, conductos y estroma (Figura 1). Los lóbulos son glándulas que producen leche, que es transportada por los conductos hacia los pezones. El estroma está compuesto por tejido conectivo y adiposo, recubriendo los lóbulos, conductos y vasos sanguíneos y linfáticos.

La mayoría de los tumores malignos de mama se originan en los conductos y con menor frecuencia en los lobulillos o acinos. La clasificación histopatológica se basa en la observación de biopsias del tumor por microscopía. La gran mayoría de los casos de cáncer de mama corresponden al tipo carcinoma, que se originan en tejidos epiteliales. En cambio, los adenocarcinomas se originan en tejido glandular y son el subtipo más común.

El análisis histopatológico debe responder dos cuestiones principales:

- 1) ¿el tumor se ha limitado al epitelio de la mama (carcinoma *in situ*) o ha invadido el estroma?
- 2) ¿el tumor se origina en los conductos o en los lóbulos?

De esta manera, teniendo en cuenta la anatomía mamaria, los tumores pueden ser clasificados en carcinoma *in situ* (ductal o intralobulillar), siendo el tumor no-invasivo más común; carcinoma infiltrante ductal, que corresponde al 80% de los tumores mamarios; e

intralobulillar que corresponde al 10% de los tumores mamarios. Existen también formas especiales de carcinomas de mama ductales infiltrantes poco comunes: medular típico, mucosecretante, ductal infiltrante favorable, adenoquístico, papilar, tubular, liposecretante, apocrino, secretorio, metaplásico y enfermedad de Paget. (4)

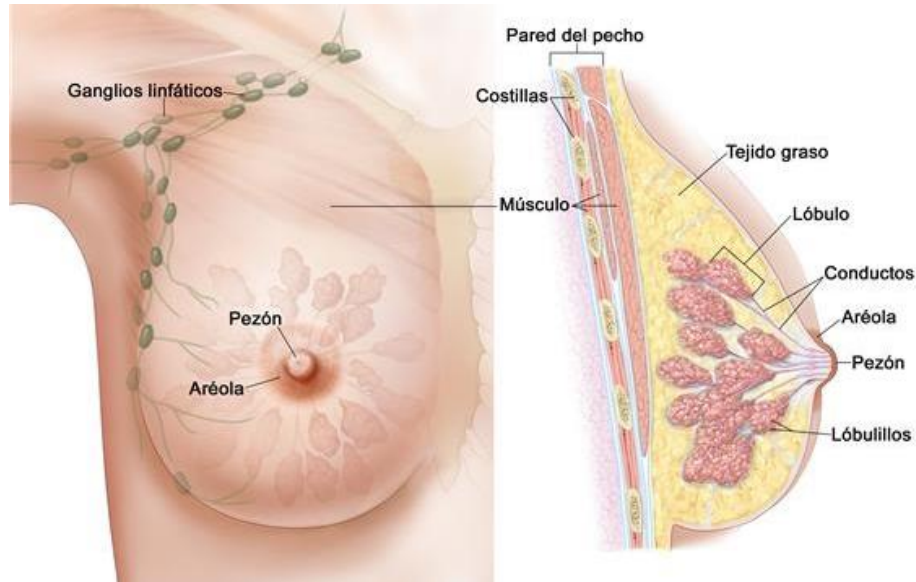


Figura 1: Anatomía de la mama femenina (Adaptado de la *American Breast Cancer Foundation*).

- Clasificación clinicopatológica:

Este tipo de clasificación se basa en la utilización de distintos receptores como biomarcadores. A pesar de que en los últimos años la búsqueda de nuevos biomarcadores se ha incrementado, en la práctica clínica se utilizan sólo 3 para clasificar a los tumores: receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y factor de crecimiento de tipo epidérmico humano 2 (HER2). Podemos entonces dividir a los tumores en:

- Receptores Hormonales positivos (ER+): son aquellos tumores que expresan ER y/o PR. Aproximadamente el 70% de los tumores mamarios corresponden a este subtipo. En general, son tumores que tienden a crecer mucho más lento que aquellos que no expresan estos receptores. A pesar de que muestran una mejor perspectiva en el corto plazo, las recidivas y el desarrollo de mecanismos de resistencia a los tratamientos son muy comunes.
- HER2 positivos (HER2+): tumores que sobreexpresan o tienen amplificado el número de copias del proto-oncogen *HER2*. Un 20% del total de tumores

mamarios corresponden a este subtipo. Los tumores crecen en forma mucho más rápida y son más agresivos que los ER negativo.

- Triple Negativos (TN): este grupo remanente abarca aquellos tumores mamarios que no expresan ni ER o PR, y tienen una expresión normal o baja de HER2. Es el grupo más agresivo de los 3 y se los trata, generalmente, con quimioterapia y/o radioterapia.

- Subtipos moleculares:

Con el desarrollo de nuevas tecnologías como *microarrays* y secuenciación, el análisis de expresión génica se convirtió en una herramienta muy importante a la hora de categorizar pacientes. La heterogeneidad de los tumores mamarios llevó a describir 5 subtipos moleculares asociados a diferentes alteraciones moleculares y perspectivas clínicas (5). Los subtipos moleculares corresponden a:

- Luminal A: Son tumores ER positivo y es el subtipo más común, abarcando aproximadamente un 50-60% de todos los tumores mamarios. Presentan altos niveles de expresión de ER y baja expresión de genes relacionados a proliferación. Además no expresan HER2 y tienen bajos niveles de Ki67, biomarcador directamente relacionado a proliferación celular. Otros marcadores moleculares distintivos de este subtipo lo comprenden las citoqueratinas luminales epiteliales 8 y 18 (de bajo peso molecular) y expresión de marcadores luminales como *GATA3*, *BCL2*, *ERBB3* y *ERBB4*. Generalmente este tipo de tumores tienen, a su vez, bajo grado histológico y baja tasa mitótica, lo que determina su buen pronóstico y bajas posibilidades de recidivas.
- Luminal B: Comprende el 20% de los tumores invasivos. Poseen un grado histológico mayor y altas tasas de proliferación, fenotipo más agresivo y peor pronóstico, en comparación con los del tipo Luminal A. Son tumores ER/PR positivo, que pueden o no tener alta expresión de *HER2*. La principal diferencia con los del subtipo Luminal A se da a nivel de expresión de genes relacionados a proliferación, ya que los del tipo Luminal B presentan mayoritariamente altos niveles de Ki67. En comparación con el Luminal A, el Luminal B se presenta en mujeres más jóvenes, con mayor grado y tamaño tumoral, compromiso nodal e invasión linfovascular al diagnóstico.
- HER2 positivos: Aproximadamente un 15-20% de los tumores mamarios invasivos corresponden a este subtipo. Son tumores que sobreexpresan y/o tienen gran número de copias del gen *HER2*, presentan alto grado histológico

y altos niveles de Ki67. Generalmente son negativos para ER/PR (o expresan bajos niveles) y muestran un peor pronóstico.

- Basales o *Basal like*: Este tipo de tumores no expresa ninguno de los 3 receptores: son negativos para ER, PR y HER2 (triple negativo). Además, tienen características de las células basales de otras partes del cuerpo, con altos niveles de expresión de marcadores basales como las citoqueratinas 5, 6, 14 y 17, y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Son tumores de grado 3, con muy mal pronóstico y corresponden a un 70-90% de los tumores TN.
- Dentro del grupo de triples negativo existe un grupo de tumores “triple negativo *No-Basal Like*” denominado “bajo en claudinas” (proteínas de adhesión intercelular). Es un grupo relativamente nuevo y menos estudiado que a diferencia del Basal, no expresa citoqueratina 5 ni EGFR (6).

Las principales características de los subtipos moleculares de cáncer de mama se muestran en la Tabla 2.

Receptor de estrógenos

El estrógeno es la hormona sexual femenina primaria, responsable del desarrollo y mantenimiento del sistema reproductor y de las características sexuales secundarias. Regula varios procesos fisiológicos, cumpliendo un rol preponderante en el desarrollo, crecimiento y diferenciación del tejido mamario. Es sintetizado a partir de colesterol, presentándose en varias formas: estrona (E_1), 17β -estradiol (E_2) y estriol (E_3). Otro tipo de estrógeno denominado estetrol (E_4) se produce solo durante el embarazo.

De las 4 formas, E_2 es el que presenta mayor actividad biológica en el tejido mamario. Los estrógenos en la mujer son producidos principalmente por los ovarios y por la placenta durante el embarazo. La hormona foliculoestimulante (FSH) estimula la producción ovárica de los estrógenos en las células de la granulosa de los folículos ováricos y el cuerpo lúteo. Una pequeña cantidad de estrógenos también se produce en otros tejidos, como el hígado, las glándulas adrenales y el cuerpo lúteo. Estas fuentes secundarias de estrógenos son especialmente importantes en las mujeres post-menopáusicas. Debe tenerse en cuenta el papel que juegan las células lipídicas en la producción de estrógenos y su relación con la obesidad (7).

Tabla 2: Diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama

Clasificación	Perfil de expresión histopatológica	Otras características
Luminal A	ER +; PR+/-; HER2-	Bajos niveles de Ki67 Bajo grado histológico Buen pronóstico
Luminal B	ER +; PR+/-; HER2+	Altos niveles de Ki67 Alto grado histológico
HER2	ER -; PR-; HER2+ (o amplificado)	Altos niveles de Ki67 Mal pronóstico
<i>Basal-like</i>	ER -; PR-; HER2-	Altos niveles de EGFR y CK5-6 Grado 3 Muy mal pronóstico
No- <i>basal like</i> o Bajo en claudinas	ER -; PR-; HER2-	Bajos niveles de EGFR y CK5-6

+, positivo; -, negativo; CK, citoqueratina

Los estrógenos difunden a través de la bicapa lipídica de una célula blanco para unirse y activar su receptor. Las principales funciones biológicas de los estrógenos se llevan a cabo a través del ER. Este receptor es miembro de la superfamilia de receptores nucleares y se presenta en 2 isoformas principales ER- α y ER- β , codificadas por 2 genes diferentes pero con grandes similitudes en los dominios de unión a ADN y estrógenos. La superfamilia de receptores nucleares posee una estructura altamente conservada con 6 regiones A-F (Figura 2). En la región N-terminal de ER- α y ER- β se encuentra el dominio AF-1 (conteniendo las regiones A y B); la región C posee un dominio de unión a ADN de tipo *zinc-finger* y un dominio C-terminal AF-2 (conteniendo las regiones E y F) que permite la dimerización, la unión a proteínas de shock térmico Hsp90 (que, en ausencia de E₂, lo mantienen en estado inactivo) o la unión a E₂ mediante el dominio de unión a ligando (LBD). La región D actúa como una

bisagra entre las regiones N y C-terminal.

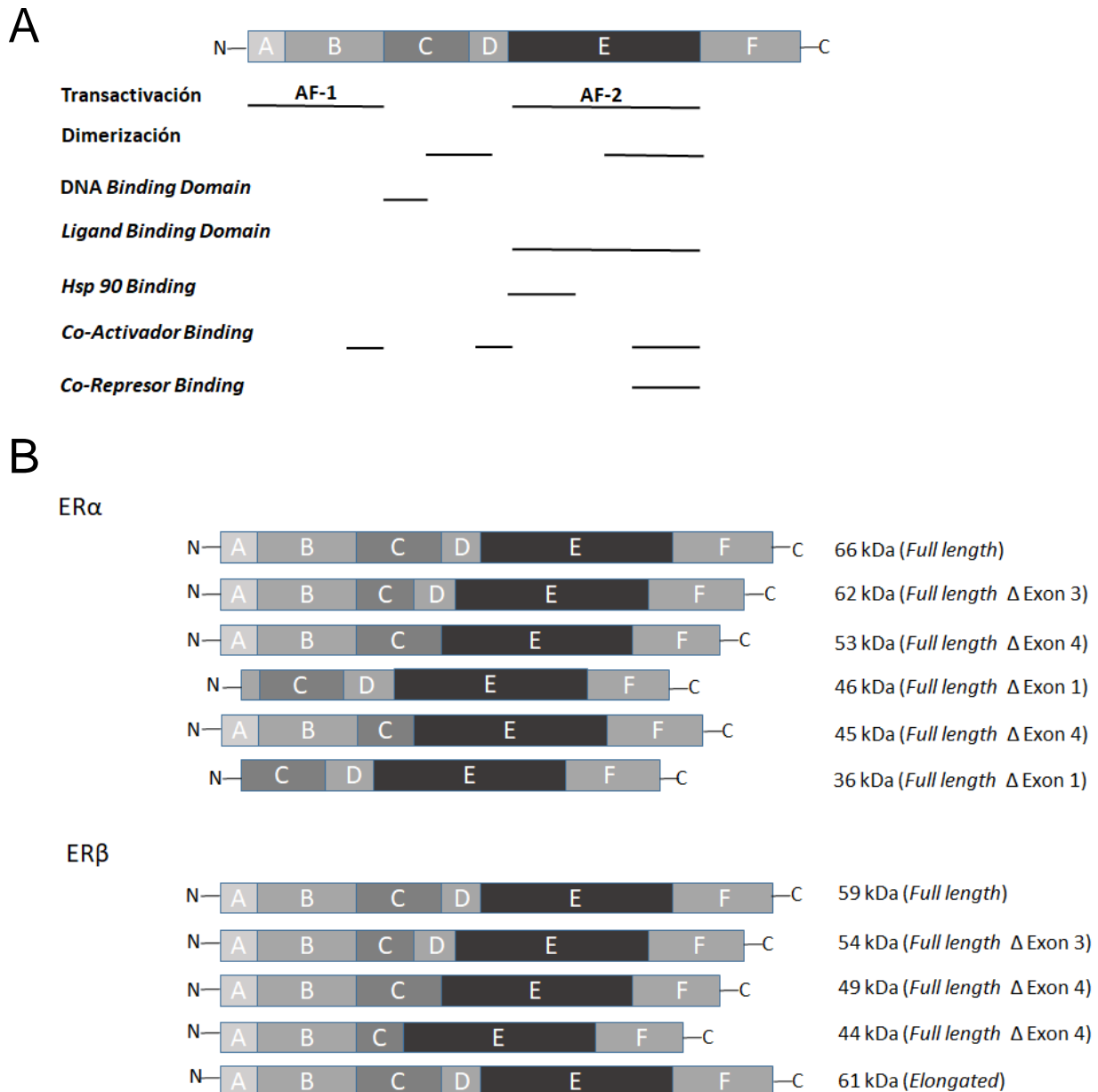


Figura 2: A) Diagrama esquemático de los dominios estructurales y funcionales de ER. Consiste en 6 dominios estructurales A-F, que contienen diferentes dominios funcionales como se muestra debajo del diagrama. **B)** Estructura de las diferentes isoformas de ER- α y ER- β .

Mecanismos de acción

El mecanismo de acción clásico o genómico del ER involucra su participación en la activación transcripcional de diferentes genes. Una vez dentro de la célula, el E₂ se une con alta afinidad al ER, provocando su dimerización y cambios conformacionales que atraen los dominios de activación AF-1 y AF-2 y reclutando proteínas co-activadoras o co-represoras.

Una vez conformado el complejo E₂-ER, éste se une a elementos respondedores a estrógeno (EREs), regiones conservadas de 13 pares de bases presentes en el promotor de diferentes genes.

Otro tipo de acción genómica del ER involucra la unión a ADN de manera indirecta, por interacción proteína-proteína del complejo E₂-ER con diferentes factores de transcripción como AP-1 o SP-1. Este tipo de interacción se conoce como acciones ERE-independientes. En ambos casos, el complejo formado provoca una remodelación de la cromatina, aumentando la actividad transcripcional de genes involucrados en proliferación y diferenciación, y particularmente en cáncer, involucrados en la estimulación de invasión, metástasis y angiogénesis (8). ER también puede llevar adelante acciones genómicas sin la necesidad de unión a E₂. Este mecanismo ligando-independiente permite la unión de ER a genes *target*. La activación de diferentes cascadas de fosforilaciones por acción de factores de crecimiento, fosforilan y activan a ER en los sitios EREs. En la actualidad se considera que el dominio AF-1 es un dominio hormono-independiente ya que es el responsable de la activación de estos tipos de acciones.

Las modificaciones post-traduccionales del ER alteran su localización celular, su actividad transcripcional y su sensibilidad a estrógenos (9). Diferentes vías de señalización participan en la regulación de la actividad de ER. En este sentido, el ER posee numerosos sitios susceptibles de ser fosforilados (la mayoría de los cuales son motivos Serina-Prolina, que se encuentran en el dominio AF-1) y activados por señales extracelulares como EGF, IGF-1, TGF-β, insulina, heregulina, que pueden emular los efectos de E₂ y regular genes *target* de ER. En muchos casos, la regulación por estas señales extracelulares se da a través de diferentes kinasas como PKA, PKC, MAPKs, c-Src, PAK1 (10).

Por otro lado, el ER puede unirse al ADN de manera indirecta, por interacción proteína-proteína del complejo E₂-ER con diferentes factores de transcripción como AP-1 o SP-1. Este tipo de interacción se conoce como acciones ERE-independientes. En ambos casos, el complejo formado provoca una remodelación de la cromatina, aumentando la actividad transcripcional.

Todos los pasos involucrados en la regulación transcripcional de los genes *target* de ER, ya sea unión a ligando, dimerización, unión a ADN y co-activadores, están controlados por el estado de fosforilación de ER.

El mecanismo de acción genómico de ER requiere la activación de la síntesis de ARN y posterior síntesis proteica. Sin embargo, un gran número de otros efectos dependientes de estrógenos son tan rápidos que no pueden depender de estos mecanismos. A este grupo de

funciones se las conoce como mecanismos no-genómicos y se cree que están regulados por asociación de un pequeño *pool* de ER a membrana. A pesar de que hay autores que no coinciden con esta hipótesis, se cree que la capacidad de ER de unirse a membrana se da por intermedio de la palmitoilación, ya que no posee dominios transmembrana. Una vez anclado a membrana, ER se asocia con diferentes proteínas, entre las que se encuentra Caveolina-1, GTPasas, Src y Ras. A su vez, también puede activar receptores tirosina kinasa (RTKs) como IGF-1, HER2 y EGFR. Todas estas acciones resultan en un aumento de la actividad kinasa de Src, activación de metaloproteasas de matriz y un aumento en la actividad kinasa de MAPK y AKT (11).

En resumen, los mecanismos de acción de ER involucran numerosas y complejas redes de señalización mediante mecanismos genómicos como el clásico de unión a EREs, la formación de complejos proteína-proteína que se unen a ADN o el mecanismo ligando-independiente. Por otro lado, los mecanismos no-genómicos involucran la asociación de ER a membrana y diferentes proteínas de señalización. En la Figura 3 se muestra un esquema representando todos estos mecanismos.

En la actualidad, se encuentra totalmente demostrado que los estrógenos tienen un rol preponderante en la iniciación y desarrollo del cáncer de mama. Una exposición prolongada a estrógenos por una menarca temprana, una menopausia tardía o la utilización de terapias de reemplazo hormonal por más de 10 años, sumados a otros factores de riesgo antes enunciados, provoca efectos estimuladores en la proliferación celular del tejido mamario, incrementando el riesgo de mutaciones espontáneas en el ADN y el riesgo de aparición de cáncer de mama.

Tratamientos

El desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para tratar el cáncer de mama ha sufrido un crecimiento exponencial en los últimos años, repercutiendo positivamente en la sobrevivencia de los pacientes. La naturaleza altamente heterogénea de los tumores mamarios y los diferentes grados, estadios y clasificaciones patológicas permiten contar con una gran batería de tratamientos disponibles que se ajustan cada vez más a las características clínicas y moleculares de los tumores. En este contexto, podemos contar con 2 grandes grupos de tratamientos: los tratamientos locales y los sistémicos.

Los tratamientos locales se denominan así porque buscan tratar al tumor, afectando lo menos posible al resto del cuerpo. Por lo general, se recurre a tratamientos locales en etapas tempranas o para casos menos avanzados. Ejemplos clásicos de estos tipos de

tratamientos lo comprenden la cirugía y la radioterapia.

Cirugía

Se estima que un gran porcentaje de mujeres con tumores mamarios deben recurrir a algún tipo de cirugía, ya sea diagnóstica (biopsia) o como parte de su tratamiento. Dependiendo el estado del paciente, la cirugía como tratamiento se puede realizar para remover totalmente el seno, incluyendo todo el tejido mamario y en ocasiones otros tejidos cercanos (mastectomía) o bien realizar cirugía con conservación de la mama.

Se realiza también cirugía para extirpar ganglios linfáticos adyacentes como una parte importante en la determinación de la estadificación del cáncer. Para saber si el cáncer de mama se ha propagado a los ganglios linfáticos axilares, se extirpa uno o más de estos ganglios linfáticos y se examinan al microscopio. Los ganglios se pueden extirpar como parte de la cirugía para extraer el cáncer de mama o como una operación separada. Los dos tipos principales de cirugía para extirpar los ganglios linfáticos son:

a) Biopsia de ganglio linfático centinela (SLNB):

El cirujano extirpa sólo el ganglio(s) debajo del brazo a donde el cáncer probablemente se extendería primero. Extraer sólo uno o algunos ganglios linfáticos disminuye el riesgo de efectos secundarios de la cirugía.

b) Disección de ganglios linfáticos axilares (ALND):

El cirujano extirpa entre 10 y 40 ganglios. Actualmente la ALND no se hace tan a menudo, pero todavía es la mejor manera de examinar los ganglios linfáticos en algunas situaciones.

Los tratamientos sistémicos o adyuvantes han permitido reducir las tasas de mortalidad debido a que pueden alcanzar células tumorales distribuidas por todo el cuerpo. Dependiendo el tipo de cáncer de mama, existen diferentes tratamientos sistémicos que pueden ser utilizados.

Radioterapia:

Involucra la utilización de rayos x de alta energía o partículas radioactivas para dañar el ADN y destruir células tumorales. No todas las mujeres con cáncer de mama necesitan radioterapia, aunque se puede utilizar en varias situaciones:

- Después de la cirugía con conservación de la mama, para ayudar a reducir la probabilidad de que el cáncer regrese en la mama o en los ganglios linfáticos adyacentes
- Después de una mastectomía, especialmente si el cáncer medía más de 5 cm, o si se encuentra cáncer en los ganglios linfáticos
- Si el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo, tal como los huesos o el cerebro.

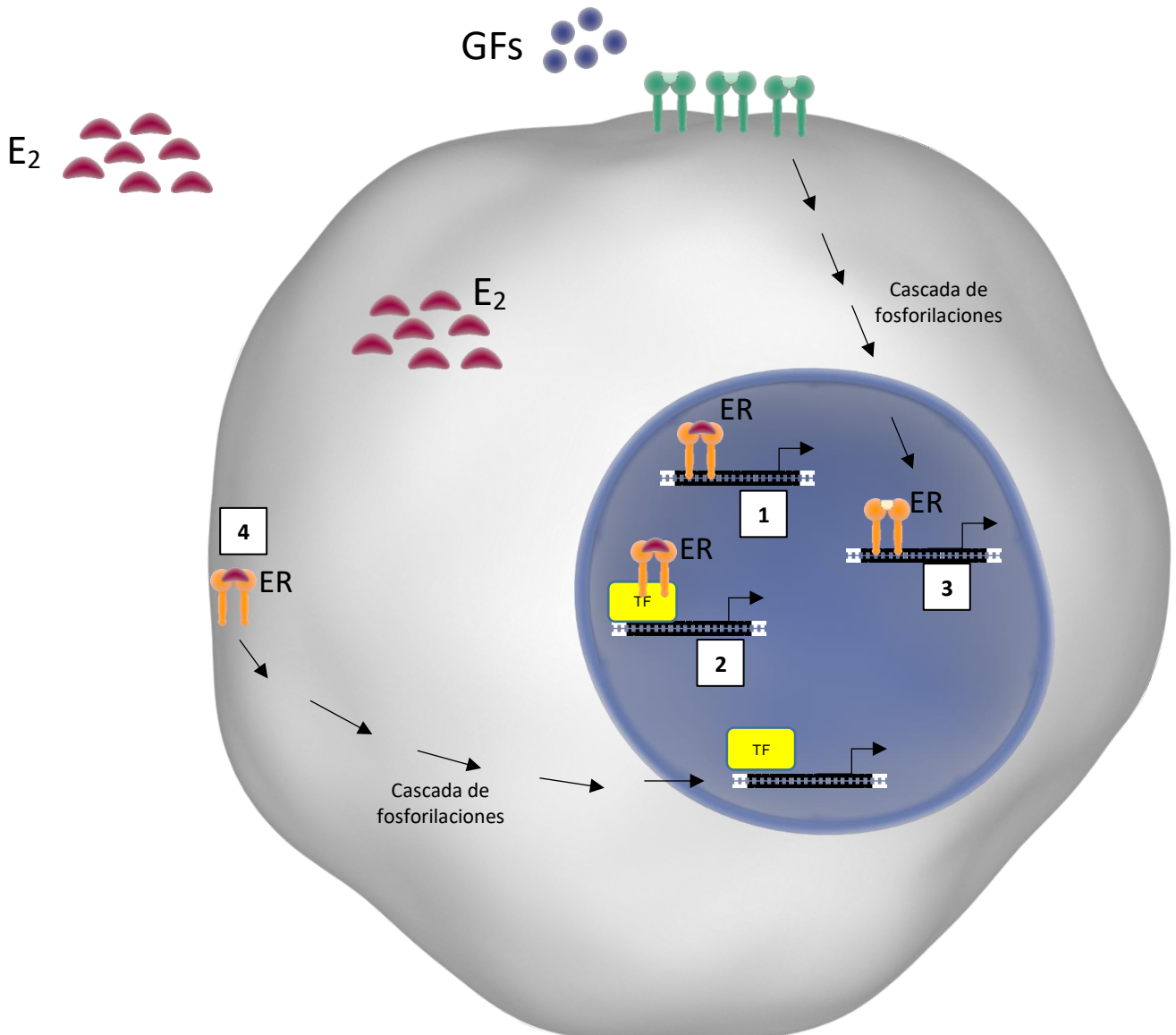


Figura 3: Diagrama esquemático mostrando los mecanismos de acción de ER. 1) Mecanismo clásico: el complejo E₂-ER se une directamente a las regiones EREs de genes diana. **2) Mecanismo ERE-independiente:** E₂-ER forma un complejo con factores de transcripción (TF), que se unen a regiones promotoras de otros genes. **3) Mecanismo ligando-independiente:** factores de crecimiento (GFs) activan cascadas de fosforilaciones, que fosforilan a ER (P) y provocan su unión a EREs. **4) Mecanismos no-genómicos:** E₂-ER anclado a membrana activa cascadas de fosforilaciones, que regulan la expresión de ciertos genes por fosforilación y activación de TF.

Quimioterapia:

Utiliza diferentes drogas que afectan e inhiben la replicación celular. A diferencia de otros tumores malignos de origen epitelial, el cáncer de mama responde a varios fármacos quimioterapéuticos. Se administra generalmente vía endovenosa y se aplica en ciclos, con periodos de descanso entre aplicación y aplicación para permitir la recuperación del paciente y reducir los efectos adversos. La quimioterapia puede ser administrada antes o después de la cirugía (tratamiento neoadyuvante y adyuvante, respectivamente). Los medicamentos más comunes utilizados incluyen la combinación de dos o tres de los siguientes medicamentos: antraciclinas, como la doxorubicina y la epirubicina; taxanos, como el paclitaxel y el docetaxel, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida y carboplatino. En cánceres avanzados de mama pueden agregarse vinorelbina, capecitabina, gemcitabina, mitoxantrona, ixabepilona y eribulina.

Terapia dirigida:

La identificación de nuevos blancos moleculares ha permitido desarrollar nuevas opciones terapéuticas que buscan inhibir el crecimiento y diseminación de las células tumorales, afectando lo menos posible a células normales. Como veremos, existen diversos tratamientos dirigidos a inhibir receptores de las tirosina quinasas (RTKs) como EGFR, HER2, HER3, o inhibidores de vías de señalización intracelulares como PI3K, mTor o ERK.

En lo referente a terapias dirigidas para el cáncer de mama HER2 positivo, se sabe que tienden a crecer y a propagarse de manera más agresiva. A tal fin, se han desarrollado varios medicamentos que bloquean esta proteína: El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal, a menudo administrado junto con quimioterapia, pero también utilizado por sí solo (especialmente si ya se intentó la quimioterapia sola). El pertuzumab es otro anticuerpo monoclonal que se puede administrar con trastuzumab y quimioterapia, ya sea antes de la cirugía para tratar el cáncer de mama en etapa inicial, o para tratar cánceres avanzados. El ado-trastuzumab emtansina es un anticuerpo monoclonal fusionado a un medicamento de quimioterapia. Se utiliza por sí solo para tratar cáncer de mama avanzado en mujeres que han sido tratadas con trastuzumab y quimioterapia. Finalmente el lapatinib, se usa para tratar el cáncer de mama avanzado, en general cuando el trastuzumab ya no muestra efecto. Por lo general, se utiliza con ciertos medicamentos de quimioterapia o terapia endócrina.

En lo referente a terapias dirigidas contra cáncer de mama ER y/o PR positivos, pero negativos para HER2, existen los inhibidores de CDK4/6. Palbociclib y ribociclib bloquean las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), particularmente CDK4 y CDK6, inhibiendo la división celular. Estos medicamentos están aprobados para mujeres post-menopáusicas y

con cáncer de mama ER positivo/HER2 negativo avanzado.

Por último, everolimus se utiliza en combinación con exemestano (para mujeres post-menopáusicas y con cáncer de mama ER positivo/HER2 negativo avanzado) o en mujeres cuyos cánceres han progresado mientras recibían tratamiento con letrozol o anastrozol. Everolimus bloquea mTOR, inhibiendo la proliferación celular. También posee efectos anti-angiogénicos, al impedir que los tumores desarrollen nuevos vasos sanguíneos, ayudando a limitar el crecimiento tumoral. Everolimus también se está estudiando para algunos tipos de cáncer de mama en etapa más tempranas, en combinación con terapia endócrina y con otros tratamientos (12).

Terapia Endócrina:

La mayor parte de los tumores mamarios son del tipo ER positivo y dependen del estímulo estrogénico para crecer y proliferar. La terapia endócrina actúa disminuyendo la cantidad de estrógenos circulante en el cuerpo o inhibiendo la unión de E_2 a su receptor. Este tipo de tratamiento es considerado la primera terapia dirigida y ha mejorado la supervivencia de millones de pacientes en los últimos 30 años.

En la actualidad existen diferentes tipos de tratamientos endócrinos. Los moduladores selectivos de ER (SERMs) actúan bloqueando la actividad de ER selectivamente en el tejido mamario. El desarrollo de esta terapia contribuyó significativamente en la disminución de las tasas de recurrencia y redujo las tasas de mortalidad en un 25-30% las últimas 3 décadas (13). Tamoxifeno (Tam) actúa por unión al dominio de unión al ligando (LDB) de ER (en el dominio AF-2), compitiendo con E_2 por el sitio de unión y provocando un cambio conformacional que impide la unión de las proteínas co-activadoras. A pesar de bloquear al ER, Tam presenta un efecto agonista parcial, debido a que el dominio AF-1 no se ve afectado y el mecanismo ligando-independiente del ER puede llevarse a cabo. El toremifeno es otro SERM que actúa de manera similar, pero se emplea con menos frecuencia y sólo está aprobado para tratar el cáncer de mama metastásico.

Los inhibidores de aromatasa (IAs) actúan inhibiendo la producción de estrógenos al inhibir la enzima aromatasa, responsable de la síntesis de esta hormona. Por lo general, esta terapia se utiliza en pacientes post-menopáusicas, que presentan bajos niveles de estrógenos. Sin embargo, pueden utilizarse en pacientes pre-menopáusicas si se los combina con ablación ovárica. Existen varios tipos de inhibidores de aromatasa, con efectos muy similares, como anastrozol, letrozol y exemestano.

Otro grupo de tratamientos endócrinos lo conforman los antagonistas del receptor de

estrógenos (*ERDs*) como fulvestrant, que se une al ER bloqueando la acción de E2 y provocando la degradación del receptor. El fulvestrant se usa para tratar el cáncer de mama metastásico, con más frecuencia después que otros tratamientos endócrinos han dejado de surtir efecto. El fulvestrant está actualmente aprobado solamente para el uso en mujeres post-menopáusicas. Algunas veces se usa “*off-label*” (fuera de las indicaciones autorizadas) en mujeres pre-menopáusicas, a menudo combinado con un agonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) para que los ovarios dejen de funcionar.

La ablación ovárica se utiliza para inhibir la producción de estrógenos de los ovarios de pacientes pre-menopáusicas. Existen 2 formas diferentes de lograrlo: a partir de una cirugía que remueva los ovarios (ablación permanente) o a partir de agentes liberadores de hormona luteinizante (ablación transitoria). Estos medicamentos se utilizan con más frecuencia que la ooforectomía. Actúan al detener la señal que el cuerpo envía a los ovarios para producir estrógeno, lo que provoca la menopausia temporal. Algunos medicamentos de LHRH son goserelina y leuprolida. Se pueden usar solos o con otros medicamentos hormonales (tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa, fulvestrant) como terapia endócrina en mujeres pre-menopáusicas (14).

Bases de datos de perfiles de expresión génica

El análisis molecular de los diferentes tipos de cáncer ha incrementado notoriamente el conocimiento acerca de las vías de señalización que se encuentran alteradas en esta enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los diagnósticos y decisiones terapéuticas se basan en las técnicas histopatológicas clásicas. En este sentido, la necesidad de un enfoque mucho más cuantitativo y específico podría mejorar el diagnóstico y proveer a los pacientes de un tratamiento racional e individualizado.

A principios de los 90', Hulka *et. al*, describieron a los biomarcadores como “alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que pueden ser medidas en tejidos humanos, células o fluidos” (15). En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud define que “un biomarcador es cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo o en sus productos, y que influencia o predice la incidencia o progresión de una enfermedad”, analizando biomoléculas como ácidos nucleicos (ADN, ARN, microARNs y otros ARNs no codificantes), proteínas (enzimas, receptores) y también modificaciones químicas (16, 17). En un sentido clínico, un biomarcador en cáncer puede brindar información

acerca del riesgo de desarrollar la enfermedad en un tejido específico o, alternativamente, puede medir el riesgo de que la enfermedad progrese o la potencial respuesta de una terapia determinada.

La utilización de nuevos biomarcadores en cáncer permitiría entender varios aspectos de la enfermedad para poder dilucidar las causas, emitir un diagnóstico más certero, evaluar la progresión y/o regresión del tumor o el éxito de un tratamiento, realizando una estratificación de los pacientes.

Las alteraciones diferenciales de un estado biológico normal a uno anormal pueden deberse a numerosos factores como la aparición de mutaciones germinales y/o somáticas, cambios transcripcionales o modificaciones post-traduccionales. Un biomarcador también puede ser un grupo de alteraciones como la expresión de varios genes o firmas proteómicas y metabólicas (18).

Clases de biomarcadores

Existen diferentes tipos de biomarcadores de acuerdo a la intencionalidad de su uso. En este sentido, los biomarcadores predictivos se utilizan para predecir la respuesta a tratamientos específicos, como es el caso de la sobreexpresión de HER2 y la respuesta a Trastuzumab. De igual manera, las mutaciones en KRAS pueden predecir mecanismos de resistencia a inhibidores de EGFR, como ocurre con cetuximab en cáncer colorectal (19-21). Por otro lado, existen marcadores pronóstico que pueden aportar información acerca de parámetros clínicos como recurrencia o progresión tumoral, aunque no estén ligados directamente a decisiones terapéuticas. Es el caso de la firma genética de 21 genes que puede ser predictiva de recurrencia y supervivencia en pacientes tratados con Tam, negativos para presencia de metástasis en nódulos linfáticos (22).

Por último, otra clase de biomarcadores son los de tipo diagnóstico, utilizados para identificar pacientes con alguna condición patológica (23).

Una característica importante a tener en cuenta a la hora de seleccionar y validar un biomarcador es el método de detección. Es necesario que el biomarcador elegido tenga un método de detección que pueda ser adaptado a plataformas clínicamente aplicables. Las técnicas generalmente utilizadas para el análisis de anomalías genéticas o proteicas incluyen RT-PCR, para determinar expresión génica o mutaciones puntuales (mutación *BRAF* V600E en melanoma por ejemplo); hibridación fluorescente *in situ* (FISH), para determinar número de copias o traslocaciones cromosomales (amplificación de *HER2* o traslocación *BCR-ABL* por ejemplo) e inmunohistoquímica (IHC), para evaluar expresión proteica o localización sub-

celular (expresión de ER en cáncer de mama entre otras).

En general, los biomarcadores pueden ser detectados por métodos no invasivos como la determinación de su presencia en fluidos (sangre, suero o plasma) o en excreciones y secreciones como heces, orina o secreciones mamarias. Otro tipo de biomarcadores pueden ser derivados de tejidos, requiriendo en estos casos la toma de biopsias o análisis por imágenes para su evaluación.

Existen ciertas características que debemos tener en cuenta a la hora de buscar nuevos biomarcadores. En primer lugar, un biomarcador debe cumplir con las clásicas medidas estadísticas como exactitud, sensibilidad y precisión. Estas características ayudan a definir qué tan bien un biomarcador puede discriminar entre diferentes grupos o fenotipos de interés. Por otro lado, la robustez da una idea de la reproducibilidad y aplicabilidad del biomarcador en la clínica. Por último, debemos entender la biología del biomarcador para poder interpretar su funcionalidad en el contexto de un grupo de genes.

Podemos contar con dos tipos de enfoques principales a la hora de realizar una búsqueda de biomarcadores. El enfoque estadístico es el método tradicional y se apoya íntegramente en la información recopilada en bases de datos “ómicas”, que reúnen la totalidad o un conjunto de información sobre genes, proteínas o relaciones entre ellos. La elección de un biomarcador por este enfoque puede considerarse confiable cuando la base de datos es lo suficientemente grande. Por otro lado, el enfoque basado en vías de señalización combina la información de bases de datos con el conocimiento biológico sobre cómo los posibles biomarcadores interactúan entre ellos. Este enfoque es el que más terreno ha ido ganando en los últimos años y permite la identificación de biomarcadores en grupo de pacientes más reducidos. En este sentido, la combinación de información molecular junto con el análisis biológico de las vías de señalización involucradas puede utilizarse para detectar tendencias en los datos, descubrir firmas genéticas que colaboren en la estratificación de pacientes y predecir respuestas terapéuticas (Figura 4).

El cáncer es una patología tan compleja que no basta con una única observación de pacientes para poder desarrollar modelos que permitan explicarla o predecir tratamientos. Afortunadamente contamos con una variedad de *tests* y análisis que nos permiten describir y cuantificar diferentes aspectos biológicos de los pacientes a partir de muestras de ADN, ARN o proteínas. Las dos técnicas de mayor relevancia a la hora de analizar información molecular para determinar presencia de biomarcadores utilizan ARN como punto de partida. La suma de todos los transcritos de ARN (transcriptoma) nos permite conocer el estado por el que las células están atravesando y entender qué funciones (y cuáles no) se estaban llevando a cabo en ese estado. Las técnicas involucradas son los *microarrays* y el secuenciamiento masivo

de ARN o RNA-seq.

La utilización de *microarrays* es la técnica tradicional y clásica para medir expresión de ARN. Desde su invención en la década de los 90's, ha sido la técnica elegida para realizar estudios de perfiles de expresión a gran escala. La capacidad de analizar decenas de miles de transcritos simultáneamente ha permitido identificar biomarcadores que se expresan diferencialmente entre un estado sano y tejidos enfermos. A su vez, se han evaluado respuestas farmacogenómicas y estudiado la regulación génica de diferentes tipos de tumores. Los *microarrays* son una técnica robusta y confiable, que consta de sondas de hibridación diseñadas con un conocimiento previo de secuencia de los genes a analizar. Por esta razón, los *microarrays* no pueden detectar variaciones estructurales o nuevas variantes génicas. Además, la hibridación limita la sensibilidad de esta técnica, al no poder detectar diferencias en la expresión de estructuras muy similares, como isoformas. La cuantificación de expresión también es una limitante, ya que solo produce niveles de expresión relativa (y no absoluta).

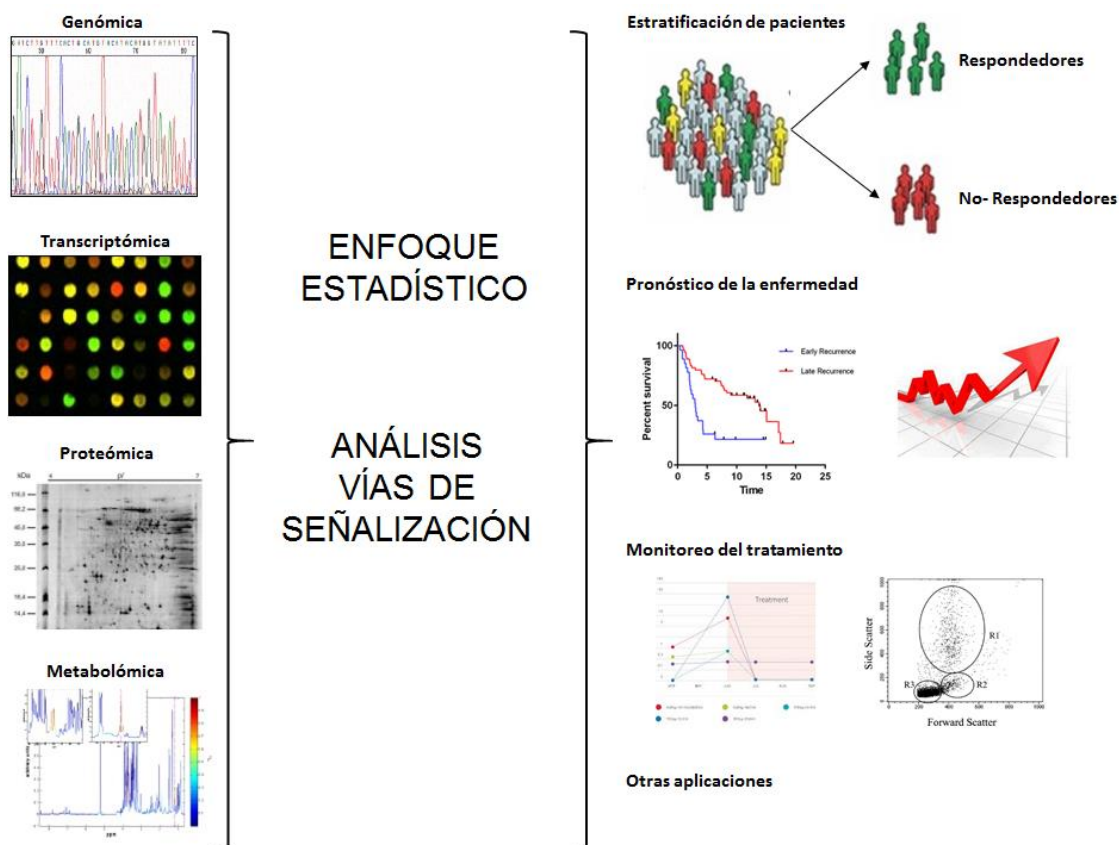


Figura 4: Esquema general de los pasos seguido en el descubrimiento de biomarcadores en cáncer

En los últimos años se han desarrollado plataformas tecnológicas que produjeron grandes avances en la investigación del cáncer. En este sentido, las plataformas *Affymetrix* e *Illumina*, por ejemplo, proveen de una superficie sólida que tiene unido una colección de miles de sondas de ADN que detectan la expresión de miles de genes previamente identificados. De esta manera, midiendo el nivel de hibridación entre la sonda y el ADN copia (*target*) a través de medidas de fluorescencia se puede analizar el nivel de expresión de cada gen, ya que se encuentra debidamente identificada la posición de cada sonda.

Con el advenimiento de la secuenciación masiva, se está produciendo un cambio en la manera de analizar y estudiar los transcriptomas. La técnica de *RNA-seq* lleva a cabo una secuenciación directa de ADNs copia, seguido de la asignación al genoma de las lecturas de secuenciación realizadas. *RNA-seq* provee de una visión completa del transcriptoma al no requerir de conocimiento previo de secuencias. En este caso, cada uno de los transcriptos es secuenciado, sea conocido o no. De esta manera, se pueden identificar variantes génicas, sitios de comienzo de la transcripción, nuevas variantes de *splicing* y monitorear la expresión de diferentes alelos. A diferencia de los *microarrays* que miden intensidad de hibridación de las sondas, *RNA-seq* mide lecturas digitales alineadas a una secuencia en particular. Debido a que se secuencian cada uno de los transcriptos individuales, esta tecnología es mucho más sensible para detectar transcriptos de baja abundancia y diferenciar isoformas. Es una técnica sumamente novedosa y con un potencial casi ilimitado, aunque el análisis de la información es mucho más complejo. Las características de las técnicas de *microarrays* y *RNA-seq* se resumen en la Tabla 3.

En la actualidad existen numerosos repositorios de acceso público, que contienen información de *microarrays* sobre expresión génica de diferentes fuentes y experimentos. Los dos más importantes son *Gene Expression Omnibus* (GEO) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) y *ArrayExpress* del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI-EMBL, por sus siglas en inglés). Ambos repositorios han ido incorporando en los últimos años experimentos de *RNA-seq*. Estas bases de datos reciben análisis de expresión de cualquier tipo, siempre y cuando cumplan con los requisitos mínimos estandarizados descritos en “*Minimal information about a microarray experiment (MIAME)*” (24).

Además de los datos de expresión resguardados en estos repositorios, una gran cantidad de información sobre cohortes de cáncer ha sido analizada y puesta al servicio de la comunidad científica. Uno de los mayores consorcios que reúnen este tipo de información

Tabla 3: Principales características de las técnicas de Microarrays y RNA-seq

Característica	Microarrays	RNA seq
Cantidad material de partida	Nanogramos	> 100 nanogramos
Señal	Semicuantitativa	Digital
Cobertura Genoma	Limitada al contenido conocido	Ilimitada (potencialmente)
Detección de Isoformas	NO	SI
Detección de variantes en secuencia	NO	SI
Utilidad clínica	Aprobado por FDA	Sin probar

lo conforma *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) que, con el objetivo de evaluar diferentes tipos de cáncer primario, brinda información sobre los niveles de ADN, ARN, proteínas y modificaciones epigenéticas de diferentes cohortes. El TCGA posee información sobre las principales alteraciones genéticas en 33 tipos diferentes de cáncer, incluyendo cambios en los niveles de expresión de mRNA, mutaciones, amplificación o aumento en el número de copias génicas y niveles de metilación. Otro consorcio similar al TCGA es el *International Cancer Genome Consortium* (ICGC), que persigue los mismos objetivos e incorpora otros estudios de diferentes países.

La enorme cantidad y abundancia de datos generados deberían servir para poder mejorar el camino recorrido a la hora de descubrir y validar uno o varios biomarcadores, y poder identificar una o varias firmas genéticas, una lista de genes cuyos niveles transcripcionales están asociados con un fenotipo determinado. En general, una firma genética está formada por un *set* de genes que comparten un patrón similar de regulación o alteración (expresión, mutación, número de copias) o una localización cromosomal cercana. Las bases de datos MSigDB y GeneSigDB reúnen información sobre diversas firmas genéticas asociadas a cáncer con valor pronóstico y diagnóstico para ser utilizadas en análisis de enriquecimiento (*gene set enrichment analysis*, GSEA) (25, 26).

Más allá de la utilización de biomarcadores en escenarios clínicos, los mismos también son de utilidad en el desarrollo de nuevos fármacos. Un biomarcador puede ser utilizado como un marcador subrogante o como un *endpoint* en la evaluación de ensayos

clínicos. En este sentido, la utilización de estas bases de datos de expresión y el descubrimiento de diferentes firmas de expresión génica nos proveen de herramientas poderosas para evaluar biológica y clínicamente una serie de características en las muestras de pacientes.

Cáncer de mama ER positivo

Aproximadamente el 70% de los tumores de cáncer de mama expresan ER. La terapia endócrina es el tratamiento de primera línea para estos pacientes y actúa bloqueando su unión al ER o disminuyendo la cantidad de estrógenos circulante en el cuerpo (27). Como se mencionó anteriormente, este tratamiento involucra el uso de diferentes drogas, dependiendo el grado del tumor mamario, la fase de la menopausia, etc. Así, dependiendo de estos factores se utilizarán SERMs como Tam; IAs, como anastrozol, letrozol, exemestano o ERDs, como fulvestrant.

Tamoxifeno

Es el SERM más prescrito y ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de mujeres con cáncer de mama ER positivo. Esta droga posee un comportamiento ambiguo: actúa como antagonista en el tejido mamario, bloqueando la activación del ER; pero funciona como un compuesto estrogénico en hueso y útero.

El tratamiento con Tam reduce casi a la mitad la tasa de recurrencia y en un 30% la tasa anual de mortalidad por cáncer de mama. Además, previene el desarrollo de la enfermedad en el seno opuesto y reduce el riesgo de desarrollar carcinoma ductal infiltrante en pacientes con carcinoma ductal *in situ* (28, 29).

Tam se une competitivamente al ER con una afinidad mucho mayor que E_2 , inhibiendo la transcripción de genes dependientes de E_2 , la proliferación celular y el crecimiento tumoral (29). Una vez unido al dominio AF-2 del ER (*ligand binding domain*, LDB) (Figura 2), se forma un homodímero ER-Tam que se trasloca a núcleo uniéndose a secuencias específicas (EREs), que se encuentran en la región promotora de genes dependientes de E_2 . La transcripción de estos genes se ve atenuada debido a que el dominio AF-2 se encuentra inactivo, provocando cambios conformacionales que también afectan al *co-activator binding domain* del ER, promoviendo el reclutamiento preferencial de co-represores.

El metabolismo de Tam se da mayoritariamente en el hígado y, en menor medida, en el tejido mamario. El citocromo P450 2D6 (CYP2D6) cataliza la transformación de Tam a varios de sus metabolitos, principalmente a través de mecanismos de desmetilación e hidroxilación

(Figura 4). Los metabolitos con mayor potencia son 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OH-Tam) y endoxifeno, siendo los responsables de sus efectos antitumorales.

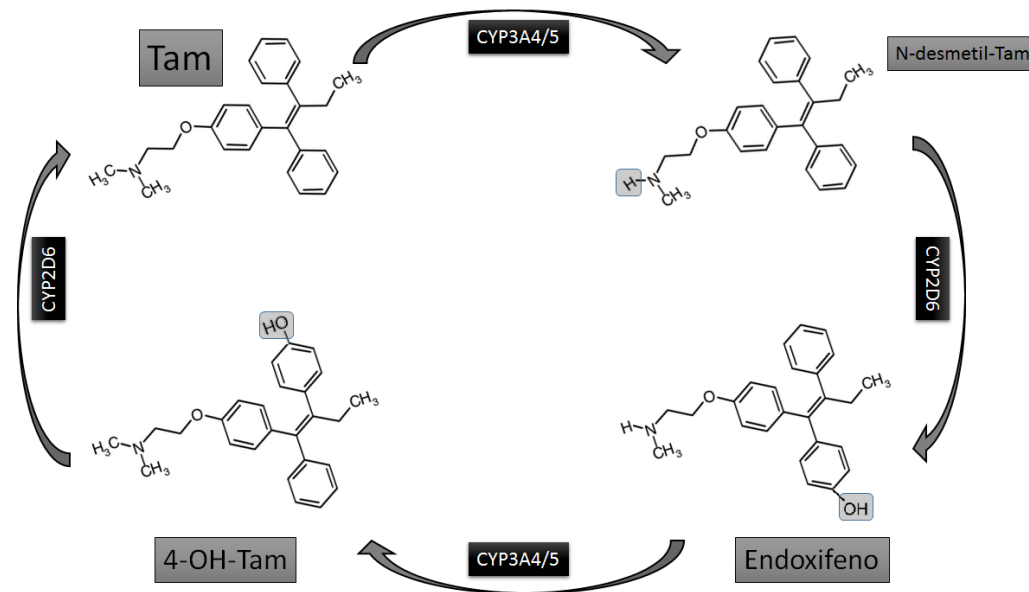


Figura 4: Metabolismo del tamoxifeno por la familia de enzimas del citocromo P450: CYP3A4/5 y CYP2D6. (Adaptado de Rondon-Lagos M et al. (29)).

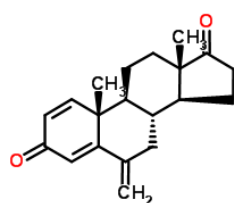
Inhibidores de Aromatasa

Una estrategia diferente al tratamiento de pacientes ER positivo la conforma el uso de IAs, que interfieren con el mecanismo por el cual el cuerpo es capaz de producir estrógenos (E_1 y E_2) a partir de andrógenos (testosterona y androstenediona), inhibiendo la actividad de la enzima aromatasa. La actividad de esta enzima se restringe mayoritariamente a tejido adiposo y muscular en mujeres post-menopáusicas, que presentan bajos niveles de estrógenos circulantes. Estos tejidos son la principal fuente de producción de E_2 una vez que la expresión de esta enzima en los ovarios deja de producirse (30).

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes generaciones de IAs, mejorando la especificidad por el blanco, reduciendo los efectos adversos y potenciando su efecto inhibitorio. Actualmente contamos con IAs de tercera generación, que se dividen de acuerdo a su estructura química en dos subtipos: los de tipo I o esteroides como exemestano y aquellos de características no-esteroides o tipo II como anastrozol y letrozol (Figura 5). Además de diferencias en su estructura química, también presentan diferentes mecanismos de acción. El exemestano es un inhibidor competitivo que se une covalentemente a la enzima

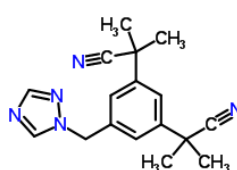
aromatasa, provocando su inhibición de manera irreversible. En cambio, anastrozol y letrozol son triazoles que interactúan con la enzima de forma reversible, impidiendo que los andrógenos se unan a ésta. La utilización de IAs está indicada como tratamiento de primera línea para aquellas pacientes con cáncer de mama ER positivo metastásico y ha sido aprobada por la FDA como tratamiento adyuvante para pacientes ER y/o PR positivo postmenopáusicas, antes o después de recibir cirugía (31). En los últimos años se ha demostrado que una buena estrategia terapéutica resulta en cambiar, después de 2-3 años de Tam, a un tratamiento con IAs (anastrozol o exemestano): este cambio mostró mejores tasas de supervivencia comparado con el tratamiento continuado de Tam (32-38).

IA de tipo I o esteroides

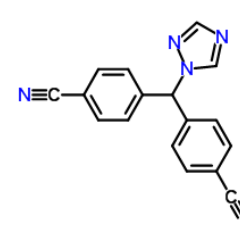


Exemestano

IAs de tipo II o no-esteroides



Anastrozol



Letrozol

Figura 5: Inhibidores de aromatasa de tercera generación.

Mecanismos de resistencia a terapias endócrinas

Uno de principales retos que afronta la medicina oncológica hoy en día es lograr revertir el desarrollo de mecanismos de resistencia a las opciones terapéuticas, tanto en terapias tradicionales como en las dirigidas a blancos específicos. En general, los mecanismos de resistencia pueden ser de dos tipos: intrínsecos o *de novo* y adquiridos. El primer grupo incluye a aquellos mecanismos presentes en pacientes que no responden a la terapia desde el inicio del tratamiento. Por otro lado, el grupo de resistencia adquirida comprende a aquellos pacientes que inicialmente responden al tratamiento pero al cabo de un tiempo recaen y la terapia deja de tener el efecto inicial.

Clasificación

Se ha demostrado que los mecanismos de resistencia, tanto *de novo* como adquiridos, dependerán del tipo de terapia endócrina que los pacientes vayan a recibir. En el caso de Tam, estos mecanismos intrínsecos comprenden principalmente la falta o pérdida de expresión de ER. Debido a que el efecto terapéutico de Tam se debe a su capacidad de

competir por el sitio de unión al ligando, la pérdida del *target* molecular es un indicativo de resistencia *de novo*. Por otro lado, se ha descrito un segundo mecanismo de resistencia intrínseca en pacientes que poseen alelos inactivos de CYP2D6, resultando en pacientes menos respondedores que no pueden convertir Tam a sus metabolitos activos (aproximadamente un 8% de las mujeres caucásicas) (28). En el caso de los IAs, actualmente se está utilizando la determinación del índice Ki67 para establecer, en un período de 2-4 semanas post-inicio del tratamiento neoadyuvante, si el paciente va a responder a dicha terapia. Está demostrado que un valor superior al 10% de este marcador de proliferación es indicativo de resistencia intrínseca para IAs (39).

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de resistencia adquirida se desarrollan después del tratamiento a largo plazo en tumores ER positivo que inicialmente han respondido a la terapia hormonal. Al igual que con los mecanismos de resistencia intrínseca, podemos diferenciarlos según la terapia recibida:

Resistencia adquirida a SERMs

A pesar del éxito que ha presentado en pacientes ER positivo desde su aprobación, un porcentaje significativo de pacientes que inicialmente responden a Tam desarrollan resistencia adquirida, con progresión tumoral y metástasis. La complejidad de la vía de señalización del ER y su interrelación con otras vías de señalización ha sido blanco de estudios intensivos para intentar dilucidar los numerosos mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia adquirida. Los tumores resistentes a Tam generalmente muestran sobreexpresión y/o elevada actividad de componentes de las vías de señalización del factor de crecimiento epidérmico. Además, el *status* de fosforilación del ER también tiene un papel preponderante en el desarrollo de fenotipos resistentes.

La actividad no-genómica del ER en conjunto con los miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER2, HER3 y HER4) y del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1, *insulin-like growth factor 1*) comprenden posibles mecanismos de resistencia endócrina. La sobreexpresión de estos receptores, en especial EGFR y HER2, puede provocar fenotipos resistentes al facilitar la comunicación con receptores tirosina quinasas (RTKs). En particular, las vías de MAPK/ERK y PI3K/AKT/mTOR son las más involucradas en el desarrollo de resistencia (40-42).

Por otro lado, la regulación de la expresión génica por parte del ER se da a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción o co-reguladores. En general, cuando el ER se encuentra unido a E₂, estimula la unión de co-activadores nucleares

que promueven la transcripción de genes proliferativos. Está demostrado que un aumento en la actividad transcripcional de factores como AP-1 o NFκ-B desencadenan fenotipos resistentes a Tam (43-45).

En los últimos años se han descrito novedosos mecanismos que permiten explicar el desarrollo de resistencia a Tam. Componentes de la vía de señalización de Hedgehog, implicada principalmente en procesos de desarrollo embrionario y diferenciación, participan en la aparición de resistencia *in vitro* (46). Por otra parte, ciertos ARNs no codificantes, en particular micro ARNs (miRNA, por su sigla en inglés) confieren resistencia a Tam tanto *in vitro* como en la clínica. Por ejemplo, la sobreexpresión de miR-221/222 confiere resistencia a Tam en células de carcinoma mamario ER positivo MCF7 y se correlaciona con la sobreexpresión de HER2 en tumores primarios de mama (47, 48). Además, miR-181b, miR-301 y miR-519a promueven un crecimiento independiente de estrógenos y resistencia a Tam en células MCF7 (49-51).

Como vimos, numerosas vías de señalización participan activamente en la adquisición de fenotipos resistentes a Tam. Además, ciertas quinasas como proteína quinasa A (PKA), MAPK o quinasa activada p-21-1 (PAK1) inducen fosforilaciones en ER o sus co-reguladores, que contribuyen al desarrollo de resistencia (Figura 6). La contribución de estos eventos al desarrollo de resistencia puede deberse a que las fosforilaciones le provocan un cambio conformacional al ER, que afecta su unión a ligandos y co-reguladores. Por ejemplo, la fosforilación en el residuo Serina 118 (Ser118) del ER disminuye la afinidad de éste por Tam, reduciendo también su unión al ADN (52). Además, se ha visto que líneas celulares resistentes a Tam presentan una elevada actividad de MAPK y ERK1/2 que correlaciona con un aumento en la fosforilación en Ser118. En la clínica, la fosforilación de este residuo ha mostrado resultados ambiguos y antagónicos: mientras que en un estudio la presencia de Ser118 fosforilada fue marcador de mayor diferenciación, buen pronóstico y mejor respuesta a Tam (53), otros estudios muestran que correlaciona negativamente con el tratamiento endócrino (54, 55).

Otro sitio de fosforilación implicado en la respuesta a Tam es la Serina 167 (Ser167) de ER, fosforilada por AKT, p90RSK y mTOR/p70S6K. La sobreexpresión de EGFR induce la fosforilación de este residuo, favoreciendo la unión de ER al ADN por unión al co-activador SRC3 y aumentando la transcripción de genes dependientes de E₂. Además, la fosforilación de Ser167 reduce la sensibilidad a Tam *in vitro* (52, 56). Sin embargo, al igual que ocurre con la Ser118, los datos provenientes de la clínica son también ambiguos, ya que no puede afirmarse con seguridad si este residuo contribuye o no al desarrollo de resistencia a Tam (54, 57, 58).

Aunque se han identificado varios sitios de fosforilación del ER implicados en resistencia a Tam en investigaciones pre-clínicas, sólo unos pocos han sido correlacionados en la clínica. Este es el caso de la fosforilación del residuo Serina 305 (Ser305) (59). Uno de los primeros estudios *in vitro* acerca de la relevancia de este sitio de fosforilación demostró que su fosforilación es suficiente para aumentar la expresión de ciclina D1 (CycD1), gen regulado por ER e implicado en la progresión de cáncer de mama (60). Un estudio reciente demostró los cambios estructurales que se desencadenan en el ER al fosforilarse en este residuo. En un modelo celular de carcinoma mamario humano se demostró que la Ser305 forma enlaces de hidrógeno con el dominio F del ER, estabilizando la hélice 12 en esta conformación, bloqueando la interacción del dominio AF-2 con los co-activadores y los co-represores, lo que permite la actividad constitutiva del dominio AF-1 o de unión a co-activadores (61).

Una vez más, la complejidad de acción de la vía del ER se hace presente a la hora de analizar posibles mecanismos de fosforilación involucrados directa o indirectamente en la adquisición de un fenotipo resistente a Tam.

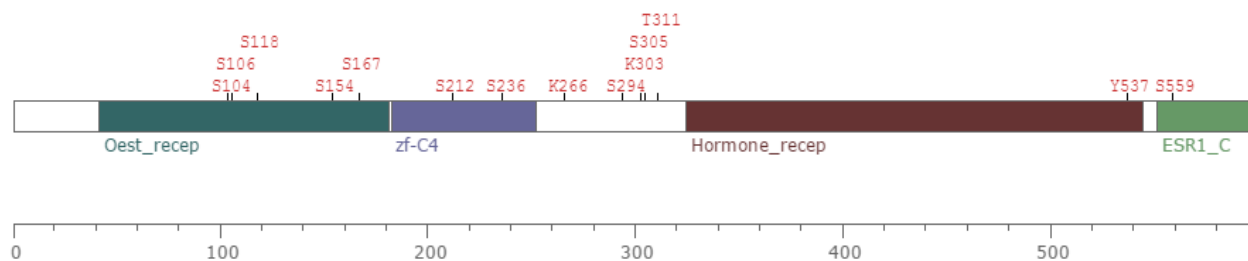


Figura 6: Sitios de fosforilación descritos en el ER (tomado de <https://www.phosphosite.org/>)

Resistencia adquirida a IAs

Teniendo en cuenta la vía de señalización de estimulación clásica de E_2 y el modo de inhibición de los IAs, existen numerosos pasos en los que pueden desarrollarse mecanismos de resistencia a estos tratamientos.

En primer lugar, los IAs pueden fallar en inhibir la enzima aromatasa de manera eficaz, permitiendo que el estrógeno residual circulante estimule el crecimiento tumoral. Las razones de esta falla son diversas: baja potencia del tratamiento (resuelto casi totalmente por el desarrollo de IAs de nueva generación) o altos niveles de expresión de aromatasa, como ocurre en pacientes pre-menopáusicas. Esta es la razón por la que, de elegir IAs como tratamiento para estas pacientes, se suele indicar complementado con ablación ovárica.

Una segunda causa de resistencia a IAs puede deberse a la presencia de fuentes alternativas de hormonas estrogénicas, como es el caso de los andrógenos suprarrenales, estrógenos sintéticos, contaminantes industriales y fitoestrógenos. En estos casos, los IAs no tienen ningún tipo de efecto. Asimismo, ciertas mutaciones en el gen de ER inducen un *feedback* negativo en la expresión de este receptor y algunas variantes de *splicing* anormales provocan la pérdida de su función, provocando resistencia a IAs (29, 62, 63). A pesar de que la frecuencia de aparición de estas mutaciones en tumores primarios es extremadamente baja (aproximadamente un 1%), ésta aumenta en pacientes con tumores metastásicos resistentes que han recibido IAs (en un intervalo del 11% al 55%) (39).

Por otro lado, se han descrito mecanismos de activación ligando-independiente del ER y/o de adaptación al tratamiento en pacientes resistentes a letrozol, ya sea por acción de otras proteínas que pueden fosforilar y activar al ER de manera independiente de E₂ o por sobreexpresión de kinasas de la vía de MAPKs e IGF-1 (64, 65).

Estrategias terapéuticas para revertir resistencia endócrina

A pesar de que el tratamiento endócrino es el elegido en tumores ER positivo, tempranos o avanzados, el desarrollo de resistencia todavía sigue siendo un problema clínico de gran importancia. El hecho de bloquear farmacológicamente una sola vía de señalización provoca una eventual recaída, debido a la complejidad de mecanismos compensatorios que logran sortear los efectos de las terapias hormonales.

En algunos casos, pacientes que desarrollaron resistencia a un tipo de terapia endócrina responden positivamente al tratamiento con un agente endócrino alternativo o combinación de varios. Por ejemplo, pacientes resistentes al tratamiento con IAs no-esteroides (anastrozol o letrozol), son respondedores al tratamiento con exemestano o fulvestrant. Sin embargo, al ser una enfermedad crónica donde las rutas de señalización intracelular se ven alteradas, el tratamiento debería contemplar el diseño de nuevos esquemas terapéuticos con blancos moleculares específicos o combinación de varios, y así mejorar la prognosis del paciente.

Numerosos estudios han explorado la posibilidad de utilizar esquemas combinados de inhibidores de diferentes vías de señalización junto con tratamientos endócrinos (Tabla 4). En este sentido, las vías de HER2, PI3K y de diferentes RTKs son los blancos en los que se ha puesto el foco de atención buscando devolver la sensibilidad a los tratamientos endócrinos. Sin embargo, considerando la complejidad de la biología tumoral y los múltiples mecanismos

involucrados en el desarrollo de resistencia, la identificación de biomarcadores y nuevos blancos terapéuticos se torna totalmente necesaria, de manera de poder desarrollar nuevos inhibidores que aporten opciones terapéuticas novedosas a pacientes con cáncer de mama resistente y/o metastásico.

Tabla 4: Ensayos clínicos completos y en curso para revertir resistencia endócrina

Estudio	Fase (nombre)	Regimen	Población	Resultado	Ref.
Orlando <i>et al.</i>	II	Tamoxifeno + gefitinib (anti-EGFR)	ER+	Mejora en PFS 10.9 vs 8.8 meses	(66)
Cristofanilli <i>et al.</i>	II	Letrozol + lapatinib (anti-EGFR-HER2)	ER+	Mejora en PFS 14.7 vs. 8.4 meses	(67)
Baselga <i>et al.</i>	III (BOLERO2)	Exemestano + Everolimus (anti-mTOR)	ER+	Mejora en PFS 10.6 vs. 4.1 meses	(68)
NCT01560416	II	Fulvestrant + ganetespib (anti-HSP90)	ER+	En curso (diciembre 2018)	(69)
NCT01202591	II (GLOW)	Fulvestrant + AZD4547 (anti-FGFR)	ER+	En curso	(70)
NCT01633060	III (BELLE-3)	Fulvestrant + BKM120 (anti-PI3K)	ER+	Finalizado (octubre 2017)	(71)
NCT02340221	III (Sandpiper)	Fulvestrant + taselisib (anti-PI3K α)	ER+	En curso (julio 2019)	(72)
NCT02107703	III (MONARCH-2)	Fulvestrant + abemaciclib (anti-CDK4/6)	ER+	En curso (febrero 2020)	(73)
NCT02028507	III (PEARL)	Exemestano + palbociclib (anti-CDK4/6)	ER+	En curso (julio 2020)	(74)
NCT02115282	III	Exemestano + entinostat (anti-histona deacetilasa)	ER+	En curso (enero 2021)	(75)
NCT01528345	II	Fulvestrant + dovitinib (anti-RTKs)	ER+	Sin mejora en PFS	(76)

PFS: Supervivencia libre de progresión (*Progression free survival*)

Desarrollo de inhibidores de proteínas de señalización

Durante los últimos años, el *screening* a gran escala de librerías químicas (HTS o *High-throughput Screening*) fue el método más utilizado en la búsqueda de nuevos fármacos. Este

método permite probar varios cientos de miles de compuestos de forma simultánea. Sin embargo, los altos costos asociados a un experimento tan masivo, junto con su complejidad técnica, quedó confinado a grandes empresas farmacéuticas y llevó a que se exploren técnicas alternativas y suplementarias.

Una alternativa novedosa al HTS es la implementación de un *screening* virtual de bibliotecas químicas (VLS o *Virtual Library Screening*). Esta técnica permite predecir la afinidad de unión de ligandos de una base de datos, a un determinado *target* o blanco molecular, con el objetivo de identificar aquellos compuestos con mejores perspectivas para realizar estudios posteriores, tanto *in vitro* como *in vivo* (77).

Las técnicas de VLS pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: los métodos basados en ligando y aquellos métodos basados en receptor. Los primeros utilizan información de un compuesto (o un grupo de compuestos) de unión conocida a un determinado blanco molecular, para identificar otros compuestos con similares características, presentes en una determinada base de datos. Por otro lado, los métodos basados en receptor utilizan estructuras tridimensionales de un determinado *target* para buscar compuestos que podrían interactuar favorablemente con él. Estas estructuras 3D pueden ser obtenidas a través de experimentos de cristalografía de rayos X, estudios de resonancia magnética nuclear o, si no se cuenta con esta información, ser predichas por modelos de homología estructural. La herramienta principal de este método la otorga el enfoque por acoplamiento o *Docking*, donde se predice la orientación de unión más favorable de una molécula para formar un complejo estable con el *target*. El sitio de interacción generalmente se restringe a unos pocos aminoácidos de probada importancia a la hora de evaluar la funcionalidad del *target* (78).

El *docking* se basa principalmente en el cálculo de los valores de energía libre producto de la interacción del ligando flexible con los aminoácidos pertenecientes a la zona de unión elegida en la proteína. Además tiene en cuenta parámetros estéricos y de distribución espacial de los átomos que forman parte de la molécula. En general mientras menores sean los valores de energía libre obtenidos, menor será la repulsión proteína-ligando. De esta manera, la interacción entre dichas moléculas estará más favorecida termodinámicamente (Figura 7). Para que los valores de energía obtenidos tengan valor predictivo, deben de ser comparados con valores de energía de complejos ligando-receptor conocidos para el blanco elegido.

La gran mayoría de las bases de datos disponibles provienen de colecciones de compuestos comerciales, por lo que se pueden aplicar ciertos filtros con el objetivo de reducir el número total de compuestos a adquirir para realizar pruebas en el laboratorio. En la

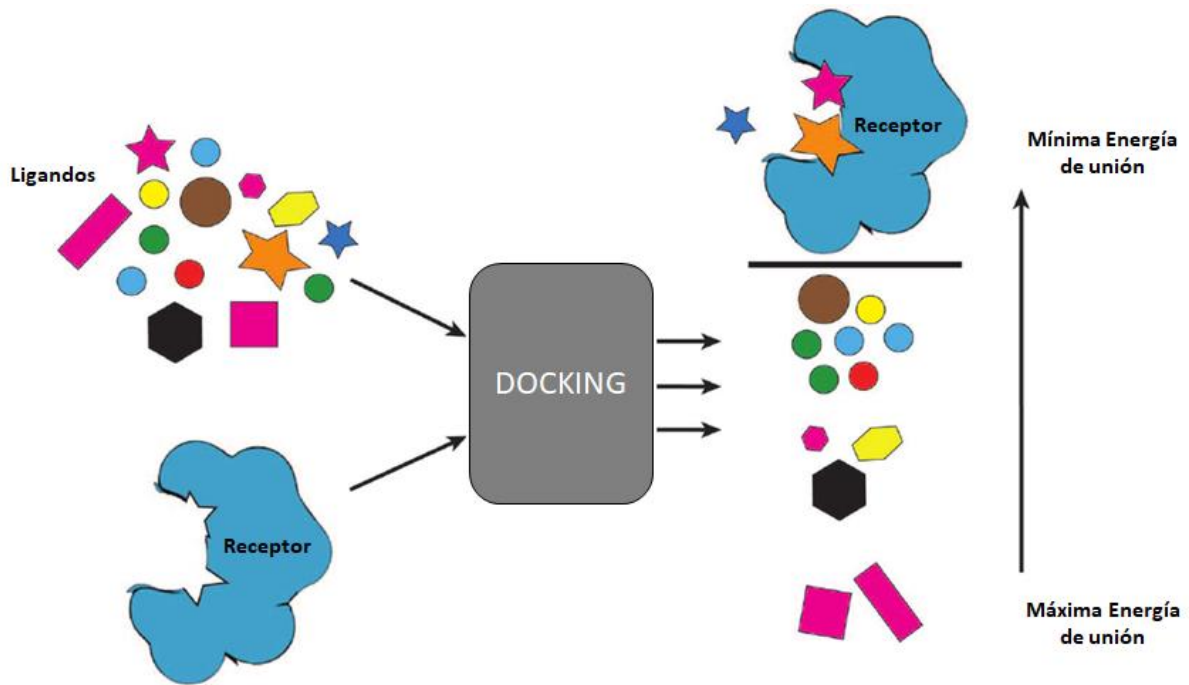


Figura 7: Diagrama esquemático de un *screening* virtual de bibliotecas químicas, utilizando la herramienta de *docking* (método basado en el receptor) (Adapatado de Jabob RB *et al.* (79)).

búsqueda de nuevos fármacos tipo *small molecule* se utiliza regularmente el filtro conocido como “la regla de cinco de Lipinski”, buscando evaluar sólo aquellos compuestos con características propias de una droga (“*drug-like*”) (80). En este sentido, esta regla concluye que un compuesto tiene más probabilidades de atravesar la membrana celular y, por lo tanto, de ser fácilmente absorbido, si cumple con los siguientes criterios:

- Peso molecular menor a 500 KDa
- Coeficiente de partición agua/octanol (logP) menor a 5 (como parámetro indicador de la lipofilicidad del compuesto)
- Grupos donores de átomos de hidrógeno para formar puentes de hidrógeno menores a 5 (generalmente es la suma de grupos hidroxilos y aminos presentes en el compuesto)
- Grupos aceptores de átomos de hidrógeno para formar puentes de hidrógeno menores a 10 (calculado como el número total de átomos de oxígeno y nitrógeno).

Diseño racional de inhibidores de Rac1

En nuestro laboratorio hemos estado estudiado en detalle el papel de la GTPasa Rac1 en los mecanismos moleculares relacionados con la invasión y metástasis tumoral (81). Las proteínas Rho constituyen una subfamilia de la superfamilia de Ras y son conocidas como GTPasas monoméricas de bajo peso molecular, para ser diferenciadas de las proteínas G heterotriméricas. Los miembros más representativos son Rac1, Rho y Cdc42. Al igual que Ras, estas proteínas ciclan entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. La proteína activa es capaz de unirse a efectores específicos que median sus efectos en la célula. Estos ciclos de activación están finamente reguladas por factores intercambiadores de guanina (GEFs o *Guanosine Exchange Factors*), proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs o *GTPase activating proteins*) e inhibidores de la disociación de GDP (GDIs o *Guanine dissociation inhibitors*).

Los GEFs son los responsables directos de la activación de las Rho GTPasas en respuesta a diversos estímulos extracelulares al catalizar el intercambio de GDP por GTP. Se encuentran clasificados en dos grupos o familias estructuralmente definidos. La familia Dbl posee un dominio homólogo a Dbl (DH o *Dbl Homology*) encargado de catalizar el intercambio de GDP por GTP; seguido de otro dominio homólogo a pleckstrina (PH o *Pleckstrin Homology*), que probablemente permita el anclaje a membrana, regulando su actividad GEF mediante mecanismos alostéricos. Existe un segundo grupo que no se encuentra relacionado estructuralmente a la familia Dbl, y está constituido por proteínas relacionadas a Dock180 (*Dedicator to Cytokinesis 180*). A diferencia de las proteínas de la familia Dbl, no poseen el tándem DH-PH, sino que presentan dos regiones altamente conservadas: DHR1 y DHR2 (*Dock-homology region-1 and -2*) (82).

Los GAPs aceleran la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rho, aumentándola en varios órdenes de magnitud. Esto provoca la hidrólisis del GTP a GDP promoviendo su estado inactivo.

Los GDIs regulan la actividad de las Rho GTPasas al unirse al C-terminal modificado con grupos isoprenoides, impidiendo su unión a membrana y reteniéndolas en el citoplasma. De esta manera, se bloquea la interacción con moléculas efectoras. La fosforilación de los GDIs conduce a la disociación del complejo, permitiendo la traslocación de las Rho GTPasas del citoplasma a la membrana, donde pueden ser activados por GEFs y unirse a efectores. Por ejemplo, tanto PAK1 como PKC (proteína kinasa C) pueden fosforilar a RhoGDIs permitiendo la translocación de Rac1 a la membrana (83).

Hasta el momento han sido identificados más de 70 GEFs, 60 GAPs y 3 GDIs que regulan la actividad de las Rho GTPasas en mamíferos, demostrando la complejidad de los mecanismos de regulación de estas proteínas y su importancia a nivel celular.

Otro determinante de la función de las Rho GTPasas corresponde a su localización intracelular, influenciada por modificaciones post-traduccionales. La mayoría de las proteínas Rho presentan un motivo CAAX (C= Cisteína, A= aminoácido alifático y X= cualquier aminoácido) en su extremo C-terminal, que puede sufrir modificaciones post-traduccionales como la adición de grupos farnesilos o geranilgeranilos. Tales modificaciones facilitan la localización de las proteínas en la membrana celular, permitiendo su activación. Además, del motivo CAAX, pueden contener una señal de localización nuclear (NLS) que promueve su transporte al núcleo donde pueden participar de diferentes vías de señalización.

Rac1, Rho y Cdc42 ejercen un importante control en la función del citoesqueleto celular, teniendo un significativo impacto sobre la adhesión y migración celular, eventos fundamentales en la invasión tumoral. Además, regulan una gran variedad de funciones celulares: median la regulación transcripcional de determinados genes; Rac1, por ejemplo, estimula la cascada de Jun quinasas (JNK) y transmite así información al núcleo para regular la expresión de genes; participan en la regulación del ciclo celular y la división celular; están involucradas en la secreción, endocitosis y fagocitosis; entre otras funciones.

Estudios realizados demuestran que la sobreexpresión de Rac1, Rho y Cdc42 inducen transformación maligna en diversos sistemas celulares. Estas proteínas son necesarias para la actividad oncogénica de Ras, ya que la inhibición de Rac1 y Rho mediante dominantes negativos, previene la transformación maligna inducida por Ras (84, 85).

La estructura cristalizada de Rac1 formando un complejo con su activador tipo GEF Tiam1 reveló residuos aminoacídicos específicos que son fundamentales para que la unión Tiam1-Rac1 se lleve a cabo (86, 87). En este contexto, el triptófano 56 (W56) de Rac1 resultó ser esencial en el reconocimiento de una serie de GEFs como TrioN y Tiam1, convirtiendo a este aminoácido en un sitio *target* interesante para bloquear la unión de GEFs a Rac1 y lograr una disminución en la capacidad metastásica de células tumorales (86, 88, 89).

Buscando identificar compuestos con alta afinidad y especificidad por el sitio de interacción de Rac1 y sus GEFs, en nuestro laboratorio se llevó adelante un *screening* virtual basado en *docking* utilizando el software "eHiTS" y 200.000 compuestos con características "drug-like" de la biblioteca de compuestos químicos de la base de datos ZINC (90). Se utilizó la estructura cristalográfica de Rac1 humana obtenida del *protein data bank*, y al W56 como la zona elegida a la cual se dirigió la búsqueda de posibles inhibidores.

A partir de los resultados obtenidos del *screening* informático, se seleccionaron un grupo de aproximadamente 15 compuestos que fueron evaluados *in vitro* con el fin de escoger aquellos que demostraran efecto anti-tumoral en un rango de concentración clínicamente relevante. Finalmente, se seleccionó al compuesto ZINC69391 (Figura S1) ya que mostró una inhibición eficiente de la progresión del ciclo celular, la proliferación y migración celular en líneas celulares de cáncer de mama altamente metastásico. Más aún, el uso de ZINC69391 *in vivo* redujo significativamente la formación de nódulos pulmonares en modelos murinos de cáncer de mama. Adicionalmente, el uso de ZINC69391 como droga parental nos permitió identificar un análogo más potente denominado 1A-116 (Figura S1) el cual demostró tener propiedades antitumorales *in vitro* y efectos anti-metastásicos *in vivo* potenciados, en comparación con ZINC69391, en diferentes tipos tumorales (91-93).

Rac1 como blanco terapéutico en resistencia endócrina

Diversos estudios han propuesto el rol de la GTPasa Rac1 en los cambios adaptativos que las células cancerígenas sufren después de recibir tratamientos como quimioterapia, radioterapia o terapias dirigidas a blancos específicos (94). Más aún, en la actualidad existen evidencias muy contundentes que sitúan a la vía de señalización de Rac1 como pieza clave en el fenómeno de resistencia adquirida a los tratamientos hormonales.

Uno de los primeros indicios del papel de esta proteína en los mecanismos de resistencia endócrina lo aportaron los estudios del activador específico de Rac1, AND-34/BCAR3. Se vio que este GEF es capaz de conferir resistencia a tratamientos endócrinos a través de la activación del eje Rac1/PAK1/CycD1. A su vez, la transfección de una versión constitutivamente activa (CA) de Rac1 provocó la resistencia al tratamiento con el antagonista fulvestrant en células ER positivas (95), mientras que el tratamiento con el inhibidor de Rac1 NSC23766 mostró un efecto anti-proliferativo en líneas celulares ER positivas y tamoxifeno resistentes (96).

Por otro lado, PAK1 es capaz de promover la fosforilación de Ser305 del ER, en ausencia de estrógeno y aumentar la expresión de CycD1 (60). Como vimos, este residuo aminoacídico está clínicamente relacionado al desarrollo de fenotipos resistente a terapias endócrinas y se encuentra directamente asociado a un aumento de la actividad transcripcional del ER (97). Además, la fosforilación de Ser305 por acción de PAK1 puede promover la fosforilación de la Ser118, sitio implicado también en la adquisición de un fenotipo resistente (98).

Diferentes participantes de la vía de señalización de Rac1, como EGFR y el activador de tipo GEF de Rac1 Vav3, aumentan la actividad transcripcional de ER en células de carcinoma mamario (99, 100), lo que indicaría que una activación aberrante de la vía de señalización de Rac1 es capaz de contribuir al desarrollo de hormono-independencia en células de carcinoma mamario, aumentando la transcripción de genes asociados al ER, aún en ausencia del ligando.

Como vimos anteriormente, la activación de diferentes RTKs o la vía PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK, entre otras, se encuentran asociados a la resistencia endocrina. Rac1 participa tanto en las vías de MAPK como en la vía PI3K, siendo nodos que vinculan directamente al EGFR y HER2 con el ER (95, 101).

Todas las evidencias antes descritas también correlacionan con datos provenientes de la clínica. Existen fuertes evidencias que muestran que los niveles altos de expresión de PAK1 en pacientes de cáncer mamario pre-menopáusicas correlacionan con falta de respuesta a Tam, aún en casos en los que el ER se exprese normalmente. En dicho estudio, se evaluaron 403 muestras de tumores primarios de mama y se muestra que la translocación de PAK1 al núcleo de las células correlaciona de manera rotunda con la resistencia a tamoxifeno (102). Otro trabajo, basado en estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y en muestras de pacientes, ubica al eje Vav3/Rac1/PAK1 como una vía central en la adquisición de resistencia a Tam. Esto evidencia una vez más que la vía de señalización de Rac1 se encuentra estrechamente vinculada con mecanismos de resistencia a terapias endocrinas (103).

La activación aberrante de diferentes vías de señalización ha sido descrita como uno de los mecanismos más importantes de compensación de los efectos anti-tumorales de las terapias endócrinas, estimulando el crecimiento tumoral y el desarrollo de resistencia. Por esta razón, el objetivo central del presente proyecto fue estudiar el papel de la GTPasa Rac1 en los mecanismos moleculares involucrados en el fenómeno de resistencia a estas terapias, tanto en modelos de carcinomas mamaros murinos y humanos, como a través de estudios de meta-análisis de bases de datos de expresión y alteraciones génicas. Además, se profundizó el estudio de los mecanismos de acción del inhibidor de Rac1 1A-116, desarrollado por nuestro grupo, explorando tratamientos combinados con tratamientos endócrinos establecidos como tamoxifeno e IAs.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar las implicancias de la GTPasa Rac1 en los mecanismos de resistencia a terapias endócrinas en cáncer de mama.

Objetivos específicos

- Analizar bases de datos seleccionadas para determinar niveles de expresión de diferentes genes vinculados directa o indirectamente a la vía de señalización de Rac1.
- Determinar la correlación entre alteraciones génicas y curvas de supervivencia.
- Identificar biomarcadores con carácter pronóstico y/o de tratamiento para establecer firmas genéticas de pacientes de cáncer de mama.
- Caracterizar el mecanismo de acción *in vitro* del inhibidor 1A-116 sobre diferentes versiones de activadores tipo GEFs y Rho GTPasas.
- Establecer modelos celulares a partir de la línea de carcinoma mamario humano MCF7, que presente sobreactivada la vía de señalización de Rac1
- Estudiar la respuesta a estrógenos en los modelos generados como en sus variante *wild type*.
- Evaluar el efecto de tratamientos endócrinos sobre los modelos resistentes.
- Estudiar el efecto *in vitro* de 1A-116 solo y en combinación con terapias endócrinas en modelos hormono-dependientes y hormono-independientes de carcinoma mamario murino y humano así como en modelos resistentes para estos tratamientos.
- Estudiar las vías de señalización involucradas en los mecanismos de resistencia endócrina.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celulares utilizadas

Se utilizaron las siguientes líneas celulares obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC): MCF7 (ATCC® HTB-22™), de carcinoma mamario humano hormono-dependiente; COS-1 (ATCC® CRL-1650™), de fibroblastos de riñón de mono verde africano. La línea celular F3II de carcinoma mamario sarcomatoide, variante altamente agresiva y metastásica, fue establecida de un clon de un tumor espontáneo hormono-independiente originado en un ratón BALB/c (104). La línea celular MCF7-LTED fue establecida al privar de estrógenos durante 1 año a la línea celular *wild-type* MCF7 y fue cedida gentilmente por el Dr. Miguel Ángel Pujana del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona (España).

MCF7, F3II y COS-1 fueron mantenidas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Co) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB), glutamina 2 mM, gentamicina 80 µg/ml. MCF7-LTED fue mantenida en DMEM sin rojo fenol (Sigma-Aldrich Co), suplementado con suero fetal bovino privado de estrógenos al 10% (charcoal stripped serum, CSS) (Cat. 12676029 ThermoFisher Scientific), glutamina 2 mM, gentamicina 80 µg/ml. Todas las células fueron mantenidas a 37 °C en atmósfera húmeda y controlada de CO₂ al 5%. Las células se sub-cultivaron regularmente usando una solución de tripsina y EDTA (Gibco, Rockville, MD, EE.UU.) diluida en buffer fosfato (PBS), utilizando procedimientos estándar.

Para la transfección estable y generación de los modelos celulares de cáncer de mama, dos días antes de la transfección, se sembraron células MCF7 en placas de 24 *wells*. La transfección se llevó a cabo utilizando FuGene HD (Roche Applied Science) en una relación 4:2, siguiendo las instrucciones del fabricante, con una versión N-terminal truncada y constitutivamente activa (CA) del GEF Tiam1 (C1199), caracterizado previamente (105, 106). El vector de expresión vacío pcDNA.3 fue también transfectado en células MCF7 para generar el modelo control (*mock*). Las células fueron incubadas durante 8 h con la mezcla de transfección y luego se cambió el medio. Al alcanzar confluencia, se sub-cultivaron y sembraron en frascos de cultivo T25, con medio suplementado con G418 400 µg/ml (Cat. 11811031, Gibco, Rockville, MD, EE.UU.). Se mantuvieron en este medio de selección durante aproximadamente 2 meses, hasta que se generaron las líneas estables. Las células con la versión truncada de Tiam1 fueron denominadas MCF7::C1199 y las células control MCF7::pcDNA.3. Ambas líneas fueron mantenidas por procedimientos estándar en DMEM sin rojo fenol (Sigma-Aldrich Co), suplementado con 10% SFB, glutamina 2 mM, gentamicina 80 µg/ml. Se realizaron chequeos regulares de expresión de Tiam1, mediante western blot. Para los ensayos de respuesta hormonal y proliferación celular *in vitro*, las células se cultivaron en DMEM sin rojo de fenol suplementado con 10% CSS.

Drogas

El inhibidor de Rac1 1A-116, desarrollado por nuestro laboratorio, fue diseñado y sintetizado en el Laboratorio de Síntesis Orgánica, Centro de Investigación y Desarrollo en Química, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) (93). 1A-116 fue solubilizado en solución acuosa pH 5.5. 17-β-Estradiol (E2758) y 4-hidroxi-tamoxifeno (Tam) (H7904) (Sigma-Aldrich Co) se prepararon como soluciones

stock 1000X en etanol absoluto, utilizando las correspondientes diluciones de etanol como tratamientos control.

Para los ensayos *in vivo*, se administró vía intraperitoneal 1A-116 10 mg/kg/día, 5 días a la semana.

Ensayos reporteros de luciferasa

Se sembraron 4×10^5 células COS-1 por *well* en placas de 6 *wells*. Las construcciones plasmídicas utilizadas se diluyeron en OptiMEM (ThermoFisher Scientific) y el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Gibco, Rockville, MD, EE.UU) fue añadido a la solución de ADN. Se incubó durante 25 min a temperatura ambiente. A continuación, los complejos ADN-Lipofectamina se añadieron a las células y se incubaron durante la noche. Posteriormente, las células (por triplicado) se trataron con vehículo (H_2O) o 1A-116 50 μM durante 24 h. Se generaron lisados celulares y se determinó la actividad luciferasa (normalizada por la actividad de Renilla), utilizando el sistema dual de ensayo reportero de luciferasa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos utilizados para los experimentos de inhibición de la actividad GEF fueron: pCEFL-AU5, vector vacío; pNM108, plásmido que codifica la versión CA de Vav1; pNM115, plásmido que codifica la versión CA de Vav2; pNM099, plásmido que codifica la versión CA de Vav3; pcDNA.3-HA-C1199, plásmido que codifica la versión CA de Tiam1; DBL-onco, plásmido que codifica la versión CA de DBL. Para los experimentos de GTPasas, los plásmidos utilizados fueron: pCEFL-AU5, vector vacío; pCEFL-AU5-Rac1 Q61L, plásmido que codifica la versión *fast-cycling* de Rac1; pJRC27, plásmido que codifica la versión *fast-cycling* de Cdc42; pCEFL-AU5-RhoA QL, plásmido que codifica la versión *fast-cycling* de RhoA; pCEFL-AU5-RhoG QL, plásmido que codifica la versión *fast-cycling* de RhoG. Por último, los plásmidos utilizados para determinar la especificidad de 1A-116 fueron pNG01 y pNG02, que codifican los mutantes Rac1 W56F Q61L y Cdc42 F56W Q61L, generados por procedimientos de mutagénesis dirigida descritos en el siguiente punto.

Generación de mutantes puntuales de Rac1 y Cdc42 mediante mutagénesis dirigida

Para la generación de diferentes mutantes puntuales de Rac1 y Cdc42 se utilizó el kit QuikChange (Agilent) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para generar el vector que codifica AU5-Rac1 W56F Q61L (pNG01), se utilizó el plásmido pCEFL-AU5-Rac1 W56F como molde y los oligonucleótidos 5'-GAT ACA GCT GGA CTA GAA GAT TAT GAC-3' (forward) y 5'- GTC ATA ATC TTC TAG TCC AGC TGT ATC -3' (reverse). Para generar el vector que codifica AU5-Cdc42 F56W Q61L (pNG02), se usó el plásmido pCEFL-AU5-Cdc42 Q61L (pJRC27) como molde y los oligonucleótidos 5'-CTC TTG GAC TTT GGG ATA CTG CAG G-3' (forward) y 5'-CCT GCA GTA TCC CAA AGT CCA AGA G-3'(reverse). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por ThermoFisher Scientific. Todas las secuencias de los plásmidos fueron verificadas en la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, España.

Determinación de los niveles de Rac1 activo (*Pull-Down assay*)

Para determinar los niveles de activación de Rac1 (conformación Rac1-GTP) en células MCF7-LTED, MCF7::pcDNA.3, MCF7::C1199 y F3II, se utilizó el ensayo de precipitación de afinidad o *pull-down*, basado en la unión de la conformación de Rac1 unida a GTP al dominio p21 de la proteína PAK1, expresado como proteína de fusión GST-PAK1 en bacterias *E.coli*. Para ello, los modelos celulares creciendo en cultivo fueron lavados con PBS y lisados con buffer de lisis 150-GPLB (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, NP40 al 0,5%, glicerol al 10%, pH 7,4) suplementado con cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas (P8340 y P0044, respectivamente, Sigma-Aldrich Co). Los lisados se clarificaron y se utilizaron de 300-400 µg de proteína total por condición. Se tomó una alícuota para la determinación de Rac1 total. En paralelo, la construcción GST-PAK1 purificada se incubó con microesferas de glutatión-Sepharosa 4B (GABs, GE Healthcare) en agitación a 4 °C durante 1 h. Luego se lavaron las microesferas dos veces con buffer de lisis. Por último, los lisados celulares se incubaron con los complejos GABs-GST-PAK1 a 4 °C durante 1 h.

Para evaluar si 1A-116 ejerce sus mecanismos inhibitorios a nivel de la interacción GEF-Rac1, o a nivel de interacción Rac1-efector, llevamos adelante 2 protocolos diferentes. Para evaluar el primer escenario, se sembraron células COS-1 en placas de 100 mm. Al día siguiente, las células se transfectaron con pCEFL-AU5 (vector vacío) o pCEFL-AU5-Rac1 Q61L usando CaCl₂ para obtener mejores rendimientos de extracción proteica. Las monocapas celulares se lavaron con PBS y se lisaron con buffer de lisis 150-GPLB suplementado con cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich Co). Los lisados se clarificaron y se utilizaron de 300-400 µg de proteína total por condición. Se retiró una alícuota para la determinación de Rac1 total. Cada lisado celular se incubó con los complejos GABs- GST-PAK1 a 4 °C durante 1 h, en presencia o ausencia de 1A-116 200 µM, utilizando vehículo como control. Para evaluar el segundo protocolo, se sembraron células COS-1 en placas de 100 mm. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con pCEFL-AU5 (vector vacío) o pCEFL-AU5-Rac1 Q61L utilizando CaCl₂ y 24 h después se trataron o no con 1A-116 50 µM durante otro período de 24 h. Las monocapas celulares fueron lavadas con PBS y lisadas en buffer de lisis 150-GPLB suplementado con cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich Co). Los lisados se clarificaron y se normalizaron las concentraciones de proteína. Al igual que en el escenario anterior, se tomó una alícuota para la determinación de Rac1 total y el resto se incubó con los complejos GABs-GST-PAK1.

En todos los casos, las microesferas conteniendo los complejos GST-PAK1-Rac1-GTP se lavaron dos veces con buffer de lisis, se resuspendieron en buffer 4X Laemmli (250 mM Tris pH 6.8, 40% Glycerol, 0.08% Azul de Bromofenol, 8% SDS, 20% β-Mercaptoetanol) hasta concentración 1X y se hirvieron 5 min. Las muestras se analizaron por western blot utilizando anticuerpo monoclonal anti-Rac1 (Sigma-Aldrich Co). La integridad de la proteína de fusión GST-PAK1 purificada se comprobó mediante SDS-PAGE y tinción con *Coomassie blue* antes de su utilización en los ensayos descritos.

Cultivo 3D de queratinocitos humanos

El establecimiento de cultivos de queratinocitos epidérmicos 3D se llevó a cabo utilizando el kit de iniciación de queratinocitos 3D (PR3D-K-50, CellnTec). Se utilizaron diferentes líneas celulares de queratinocitos humanos Ker-CT transfectadas establemente con diferentes versiones activas de miembros de la vía de señalización de Rac1: Ker-CT-VAV2-onco (versión CA del activador de tipo GEF Vav2), Ker-CT-Rac1F28L (versión *fast cycling* de Rac1) y Ker-CT-PAK1 T423 (versión CA del efector de Rac1 PAK1). Brevemente, se cultivaron en insertos de 0.6 cm² (Millicell), contenidos en placas de cultivo de 60 mm, en presencia de medio de cultivo específico para la diferenciación (CnT-Prime Epithelial Culture Medium, CellnTec) para inducir la formación de cultivos tridimensionales. Se las incubó hasta alcanzar confluencia (2 días aproximadamente), se reemplazó el medio CnT-Prime con Medio de barrera 3D (CnT-PR-3D) dentro y fuera del inserto, durante 15-16 h para permitir la formación de uniones intercelulares. Para iniciar la formación de cultivos 3D, se aspiró todo el medio del interior del inserto y se reemplazó el medio externo con medio de diferenciación CnT-PR-3D fresco hasta el nivel de la membrana, cambiándolo cada 2-3 días, tratando o no con 1A-116 100 nM, durante aproximadamente 11 días. Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron en el servicio de Patología del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca, España), fijando los cultivos 3D durante 16 h a 4 °C, llenando el well y el interior del inserto con paraformaldehído al 3.7%. Se cortó la estructura tipo piel/ membrana y se procedió a la inclusión en parafina y posterior tinción con hematoxilina y eosina, siguiendo procedimientos estándar.

Inmunofluorescencia y teñido con hematoxilina y eosina

Se cultivaron células COS-1 en placas de 6 wells y se transfectaron con el plásmido pNM42 (Rac1 Q61L, fusionado en su N-terminal con EGFP), o el vector vacío pEGFP-C1 (como control), utilizando Lipofectamina 2000 (GIBCO), según instrucciones del fabricante. Para ello, se mezclaron 1 µg de los plásmidos y 3 µl de Lipofectamina en 100 µl de OptiMEM sin SFB. A continuación se añadió la mezcla de transfección a cada well (por triplicado), se cultivaron las células durante 24 h y se tripsinizaron. Luego, se sembraron las células en cubreobjetos recubiertos de poli-lisina, se esperó unos 30 min y se trataron con vehículo (H₂O) o 1A-116 50 µM durante 24 h adicionales. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3,7% en PBS y sometidas a técnicas de inmunofluorescencia convencionales. Brevemente, las células se permeabilizaron con tritón X-100 0,5% en TBS-T (Tris-HCl 25 mM [pH 8,0], NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1%) durante 10 min, en agitación suave. Se retiró el *buffer* de permeabilización y se lavaron con TBS-T (3 veces durante 5 min), para luego bloquear los cubreobjetos durante 10 min con solución de bloqueo (albúmina de suero bovino al 2% (BSA), azida de sodio al 0,1%, tritón X-100 al 0,1%, Tris 25 mM (pH 7,5)) (BSA TBS-T al 2%), agitando suavemente. Para visualizar el citoesqueleto de F-actina, las células fueron incubadas posteriormente con Alexa Fluor 635 conjugado a faloidina (Molecular Probes, Life Technologies), diluido 1:200 en solución de bloqueo durante 20 min; lavadas tres veces con TBS-T y teñidas con DAPI para visualizar los núcleos. Las preparaciones teñidas se montaron sobre portaobjetos de microscopios usando Mowiol (Calbiochem). Las muestras se analizaron por microscopía confocal utilizando un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo de 63X (Leica).

En el caso de los análisis de tumores y pulmones, los ratones se sacrificaron y los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 3.7% durante 24 h. Luego, se lavaron en PBS y se embebieron en parafina. Se tiñeron secciones de dos micrómetros con hematoxilina y eosina siguiendo procedimientos estándar.

Western Blot

Para analizar diferentes proteínas mediante western blot, las células utilizadas en este trabajo fueron sembradas en placas de cultivo de 100 mm en medio de cultivo correspondiente. Según se especifique, las células fueron tratadas o no con diferentes drogas y luego del período de tratamiento, se lavaron dos veces con PBS. Se prepararon extractos de proteínas homogeneizando número igual de células sobre hielo en buffer RIPA (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, SDS al 0,1%, desoxicolato al 0,5% y NP40 al 1%) suplementado con cóctel de inhibidor de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich Co). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford para normalizar las muestras. Posteriormente, fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas mediante western blot. Las proteínas fueron detectadas mediante kit de quimioluminiscencia (Kalium Technologies) y las imágenes obtenidas a través de C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner (LI-COR). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

- anti-Tiam1 (sc-872, Santa Cruz Biotechnology, Inc.);
- anti-ER- α (sc-543, Santa Cruz Biotechnology, Inc.);
- anti-fosfo- ER- α Ser305 (05-922R, EMD Millipore);
- anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) Antibody (Cell Signaling);
- anti-fosfo-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) (Cell Signalling).
- anti- β -Tubulina (ab6046, Abcam)

Análisis de bases de datos de expresión génica

Se llevó adelante una búsqueda de diferentes sets de datos de expresión génica de pacientes de cáncer de mama en los repositorios públicos GEO (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org/index.do>). Se consideraron sólo aquellos sets de datos que incluían al menos 30 pacientes ER positivos, con información de sobrevida y tipo de tratamiento recibido. Los genes evaluados corresponden a componentes de la vía de señalización de Rac1 y aquellos para los cuales se contaba con información bibliográfica de su relevancia en el desarrollo de resistencia a terapias endocrinas. La generación de curvas de sobrevida se llevó adelante utilizando el software PRISM 6, Version 6.01 (GraphPad Prism6® Software Inc., La Jolla, CA, USA), estratificando a los pacientes en grupos de “baja” (LOW) y “alta” (HIGH) expresión del gen a evaluar. Para ello, se utilizó a la mediana como valor de corte: todo valor por encima de la mediana fue considerado de “alta” (HIGH)

expresión. Por el contrario, todo valor por debajo de la mediana, fue considerado de “baja” (LOW) expresión.

El set de datos GSE42568 (n=121; 17 muestras de tejido normal, 67 de pacientes ER positivo y 37 ER negativo) se utilizó para evaluar la expresión de los genes estudiados en muestras de tejido normal y compararla con muestras de cáncer de mama.

Las sondas evaluadas fueron: “213135_at” para *TIAM1*, “218807_at” para *VAV3*, “209435_s_at” para *ARHGEF2*, “209012_at” para *TRION*, “208640_at” para *RAC1*, “226957_x_at” para *RALBP1*, “213385_at” para *CHN2*, “224451_x_at” para *ARHGAP9*, “206298_at” para *ARHGAP22*, “209794_at” para *SRGAP2* y “202161_at” para *PAK1*. Estas sondas corresponden a las plataformas de GEO identificadas como “GPL96” (para HG-U133A) y “GPL570” (para HG-U133 Plus 2.0), ambas de Affimetrix®. Se utilizó JetSet para identificar a la sonda más representativa (107)

Al analizar el repositorio cBioPortal for Cancer Genomics seleccionamos al proyecto METABRIC (n=2509 pacientes) (108), filtrando los pacientes que se utilizaron para el análisis como se detalla en el apartado de resultados.

Determinación del tiempo de duplicación de los modelos MCF7

Para la determinación del tiempo de duplicación, se sembraron 3×10^4 células MCF7::pcDNA.3 y MCF7::C1199 por *well* en placas de 12 *wells*. Se realizó un recuento de células viables cada 24 h durante 72 h utilizando el método colorimétrico de azul tripán. El tiempo de duplicación se calculó durante los últimos 3 días de la fase de crecimiento exponencial.

Ensayos de migración en herida

Se determinó la capacidad migratoria de los modelos generados utilizando un ensayo de migración en herida, descrito por Segatori et al. (109). Para ello, sobre monocapas confluentes de células MCF7::pcDNA.3 y MCF7::C1199 creciendo en placas de 6 *wells*, se generaron heridas *in vitro* raspando la superficie con una punta de pipeta estéril. Luego de 16 h de incubación en DMEM suplementado con 10% SFB o CSS, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % en PBS y teñidas con azul de metileno. Se obtuvieron diez microfotografías aleatorias por *well* y se cuantificó el área de migración utilizando el software NISElements 3.0 (Nikon). El área de la herida al final de la incubación fue normalizada al área máxima de herida (herida control).

Ensayos de proliferación celular

5×10^3 células MCF7::pcDNA.3, MCF7 :: C1199, MCF7-LTED y $1,5 \times 10^3$ F3II se sembraron en placas de 96 *wells* y 24 h después se trataron con diferentes concentraciones de 17-β-Estradiol (ensayos de respuesta hormonal) o Tam, Anastrozol, Letrozol y 1A -116 (ensayos de proliferación celular) durante 72 h y se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC50). Para evaluar la reversión de la resistencia a Tam mediante tratamiento combinado con 1A-116, se trataron células MCF7::C1199 con Tam (0,01 μM, 0,1 μM y 1 μM), 1A-116 (4 μM, concentración que produjo 30% de inhibición - IC30-) o una combinación de ambos durante 72 h. Para evaluar la reversión de la resistencia a IAs mediante

tratamiento combinado con 1A-116, se trataron células MCF7-LTED con Anastrozol o Letrozol (10 μM), 1A-116 (10 μM - IC30-) o una combinación de ambos durante 72 h. Se determinó la proliferación celular mediante ensayo colorimétrico de cristal violeta. El análisis de los resultados se evaluó utilizando el software PRISM 6, Versión 6.01. Los resultados mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes.

Fraccionamiento sub-celular para evaluar translocación citosol-núcleo de PAK1

Se realizó un fraccionamiento sub-celular de MCF7::C1199 utilizando diferentes *buffers* de astringencia creciente, como describió Holden et al. (110). Brevemente, se sembraron células MCF7::C1199 en placas de 6 *wells*, reemplazando el medio al día siguiente con DMEM sin rojo de fenol suplementado con 10% CSS. Se trató con Tam 1 μM solo o en combinación con 1A-116 4 μM durante 24 y 48 h. El fraccionamiento sub-celular se realizó utilizando *buffer* digitonina para obtener la fracción citosólica (preparado con NaCl 150 mM, HEPES 50 mM pH 7,4 50 mM y 25 $\mu\text{g/ml}$ de digitonina (D141, Sigma-Aldrich Co) y *buffer* RIPA (para obtener las fracciones nucleares). Las muestras se separaron por SDS-PAGE. Las proteínas se detectaron mediante western blot utilizando anticuerpos anti-PAK1 (ab40852, Abcam) y anti-fosfo-PAK1 (ab40795, Abcam). Se utilizó anti- β -tubulina (ab6046, Abcam) para el control de carga del citosol y Lamin B1 (ab133741, Abcam) para el control de carga nuclear. Las proteínas se detectaron mediante kit de quimioluminiscencia (Kaliu Technologies) y las imágenes obtenidas a través de C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner (LI-COR).

Determinación de los niveles de fosforilación del ER por citometría de flujo

El estado de fosforilación del ER en el residuo Ser305 se determinó mediante citometría de flujo utilizando una versión modificada del método descrito por Chow et al. (111). Brevemente, se trataron células MCF7::C1199 con Tam 1 μM , 1A-116 4 μM o una combinación de ambos durante 24 h. Las suspensiones celulares se fijaron utilizando paraformaldehído al 3.7 % en PBS a temperatura ambiente. Después de la fijación, las muestras se resuspendieron en metanol frío al 90% en PBS durante 15 minutos a -20 °C. A continuación, las muestras se lavaron dos veces con PBS. Finalmente, las células se marcaron con el anticuerpo primario anti-fosfo-receptor estrogen (Ser305) (05-922R, EMD Millipore) 30 min a 4°C, se lavaron en PBS y se marcaron usando un anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con FITC (AP132F, EMD Millipore). Luego se lavaron las células en PBS y se adquirieron los resultados mediante citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) y analizados mediante el software FlowJo. Se calculó la intensidad geométrica media de fluorescencia relativa (gMFI) dividiendo las unidades de gMFI de cada tratamiento por las unidades de gMFI del control (niveles basales de fosfo-Ser305 ER) en cada muestra y se expresó como porcentaje de control.

Ensayos *in vivo*

Animales

Se adquirieron ratones Balb/C y N:NIH(S)-nu (inmunosuprimidos) hembras libres de patógenos de 6-8 semanas de edad del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata,

Buenos Aires, Argentina. Se mantuvieron de 4-8 ratones por jaula, en el Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum* y se controló diariamente su estado general de salud. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado de Animales de la Universidad Nacional de Quilmes.

Progresión tumoral

Para evaluar la capacidad tumorigénica del modelo MCF7::C1199, se inyectaron 5×10^6 células MCF7::pcDNA.3 y MCF7::C1199 (en DMEM libre de suero) subcutáneamente en ratones hembras inmunosuprimidos. El prendimiento y posterior progresión tumoral se midió diariamente con un calibre automático y el volumen tumoral se calculó con la fórmula: $0,52 \times \text{ancho}^2 \times \text{longitud}$. Se determinó también la tasa de crecimiento tumoral. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se removieron los tumores y los pulmones, se los fijó en formaldehído 3,7% y solución de Bouin, respectivamente y se determinó el número de lesiones pulmonares (espontáneas), utilizando una lupa de disección.

Para evaluar el efecto *in vivo* de 1A-116, se inyectaron 2×10^5 células F3II (en DMEM libre de suero) subcutáneamente en ratones hembras Balb/C. Se conformaron 2 grupos experimentales: Control y 1A-116. Al día siguiente de la inoculación comenzó el tratamiento, utilizando las dosis descritas en el apartado "Drogas". El tratamiento continuó hasta que uno de los grupos alcanzó una media de volumen tumoral de 2000 mm^3 . Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y diseccionados.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó adelante utilizando el software PRISM 6, Version 6.01 (GraphPad Prism6® Software Inc., La Jolla, CA, USA). Los resultados de este trabajo se expresaron como media \pm SEM; media \pm SD; media \pm intervalo de confianza (IC); o mediana. Para los análisis de grupos múltiples se aplicó ANOVA de una o dos vías, seguido de la prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey, o la comparación de IC al 95%, según corresponda. La distribución normal de los datos se determinó usando la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson. Además, se evaluó la homoscedasticidad con la prueba de Bartlett. Para los datos que no seguían una distribución normal o cuando la homoscedasticidad no se cumplía, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis.

El análisis del tiempo de duplicación, la concentración inhibitoria 50 (IC50) y crecimiento tumoral se llevó a cabo mediante regresión lineal o no lineal, según corresponda.

El análisis de las curvas de supervivencia de las diferentes bases de datos de pacientes se realizó mediante log rank test. El valor de corte utilizado para clasificar los grupos (baja vs. alta expresión) fue la mediana \pm Q1-Q3 del set de datos utilizado.

En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$

RESULTADOS

CAPITULO I - Estudio farmacodinámico
y de mutagénesis dirigida de la
interacción de 1A-116 con la GTPasa
Rac1

Las Rho GTPasas son proteínas claves que controlan y conectan la transducción de señales externas con efectores citoplasmáticos y nucleares. En los últimos años, el desarrollo de herramientas genéticas y farmacológicas ha permitido una explicación mucho más precisa del rol que estas proteínas juegan en cáncer. La hiperactivación y la sobreexpresión de Rac1 están asociadas con diferentes tipos de cáncer agresivos. Por esta razón, la interferencia de la interacción de Rac1 con sus activadores directos de tipo GEF ha demostrado ser una estrategia viable para inhibir la actividad de Rac1. En este sentido, mediante estrategias de *screening* virtual basado en *docking* y diseño racional de análogos mejorados, nuestro grupo logró desarrollar a 1A-116, un inhibidor farmacológico tipo *small molecule* (Figura S2) que ha mostrado sus efectos anti-tumorales en diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, glioblastoma y leucemia mieloide aguda. Por lo tanto, el objetivo principal de este capítulo fue realizar una descripción detallada del mecanismo de acción mediante el cual 1A-116 ejerce sus efectos inhibitorios.

1A-116 inhibe la activación de SRE mediada por diferentes GEFs

Con el objetivo de identificar qué interacciones entre diferentes GEFs y Rac1 eran inhibidas por el tratamiento con 1A-116, utilizamos el sistema reportero SRE-Luc, conteniendo al elemento respondedor al suero (SRE) fusionado al gen de la luciferasa. Al día cero, se co-transfectaron células COS-1 con diferentes versiones activadas de GEFs (o el vector vacío (EV) como control negativo) junto con los plásmidos reporteros SRE-Luc y renilla. Luego de 24 h, las células fueron tratadas o no con 1A-116 50 μ M, y se generaron lisados celulares para evaluar la actividad luciferasa (normalizada a la actividad de renilla). La concentración de 1A-116 utilizada no mostró efectos anti-proliferativos en estas condiciones (datos no mostrados). Los GEFs utilizados fueron los miembros de la familia Vav: Vav1 Δ 1-189, Vav2 Δ 1-186 y Vav3 DH-PH-ZF; además de Tiam1 C1199 y DBL oncogénico. En este sentido, las células COS-1 transfectadas y tratadas con vehículo mostraron un incremento de la activación de SRE-Luc de 3 veces, en el caso de Tiam1; 7-10 veces para los miembros de la familia Vav (Vav1, Vav2, Vav3) y hasta 12 veces, en el caso de DBL oncogénico. En cambio, el tratamiento con 1A-116 inhibió la activación de SRE mediada por estos GEFs, con porcentajes de inhibición que variaron desde un 40-50% para los Vavs, un 60% para la actividad de DBL y un 75% para Tiam1 (Figura 1 A). El control de expresión proteica por western blot mostró la expresión de todas las proteínas exógenas y que el tratamiento con 1A-116 no alteró sus niveles de expresión (Figura 1 B-D).

1A-116 inhibe la activación de SRE mediada por Rac1/RhoA-G

Buscando evaluar la capacidad de 1A-116 de inhibir la actividad de otras Rho GTPasas diferentes de Rac1, utilizamos el sistema reportero SRE-Luc. Al igual que en el apartado anterior, se co-transfectaron células COS-1 con diferentes versiones de Rho GTPasas, junto con los plásmidos SRE-Luc y renilla. El tratamiento con 1A-116 por 24 h no solo inhibió la activación de SRE mediada por Rac1 (en un 40%), sino también la mediada por RhoA y RhoG (55% y 75% de inhibición, respectivamente). Por otro lado, 1A-116 no mostró efecto alguno sobre la activación de SRE mediada por Cdc42 (Figura 2 A). Una vez más, el control de expresión proteica por western blot mostró la expresión de todas las proteínas exógenas y que el tratamiento con 1A-116 no alteró sus niveles de expresión (Figura 2 B).

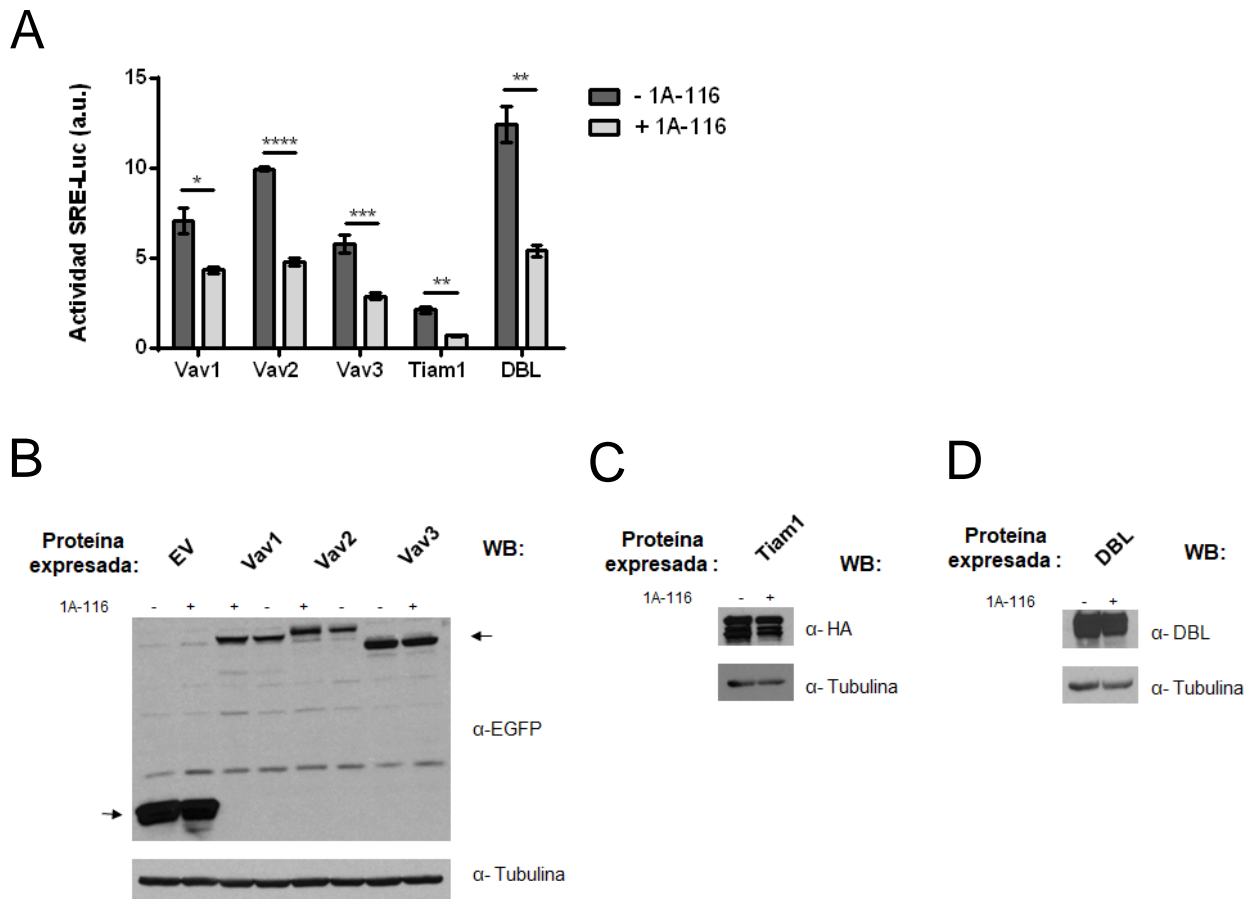


Figura 1: 1A-116 inhibe la activación de SRE mediada por diferentes GEFs. A) Se co-transfectaron células COS-1 con versiones activas de diferentes activadores tipo GEFs junto con los plásmidos reporteros SRE-Luc y *renilla*, se trataron (+ 1A-116, gris claro) o no (-1A-116, gris oscuro) con 1A-116 50 μ M y se midió la actividad luciferasa. **B-D)** Controles de expresión por western blot de las proteínas exógenas transfectadas. Se informa la proteína expresada y los anticuerpos primarios utilizados (WB) fueron: α -EGFP para EV, Vav1 Δ 1-189, Vav2 Δ 1-186 y Vav3 DH-PH-ZF; α -HA para Tiam1 C1199; α -DBL para DBL onco y α -Tubulina como control de carga. Barras de error, S.E.M. t test; ns, no significativo; * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001, vehículo vs. 1A-116 para cada proteína. La expresión de luciferasa se relativizó al valor de expresión de *renilla* (control de transfección) y los valores informados corresponden a incremento de actividad con respecto a la media de expresión de luciferasa del vector vacío (EV), en unidades arbitrarias (u.a.). Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

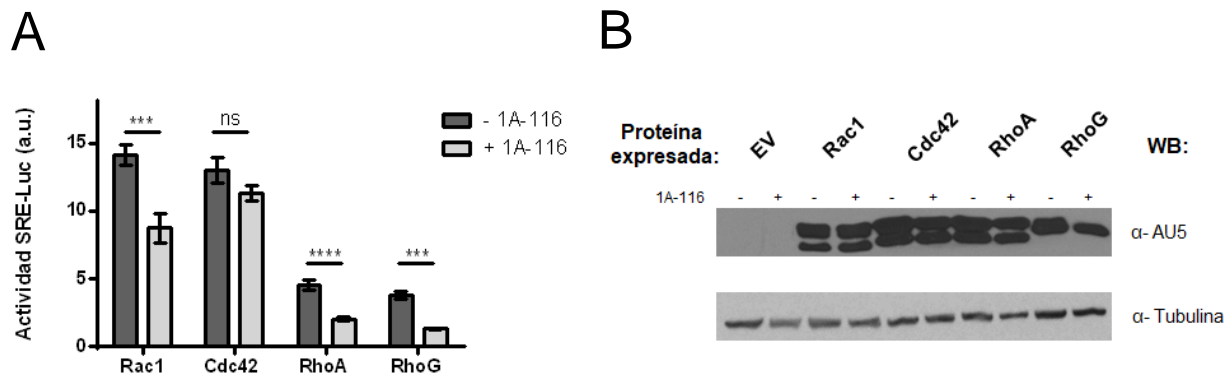


Figura 2: 1A-116 inhibe la activación de SRE mediada por Rac1/RhoA-G, pero no por Cdc42. A) Se co-transfectaron células COS-1 con versiones activas de diferentes Rho GTPasas y los plásmidos reporteros SRE-Luc y renilla, se trataron (+ 1A-116, gris claro) o no (-1A-116, gris oscuro) con 1A-116 50 μ M y se midió la actividad luciferasa. B) Controles de expresión por western blot de las proteínas exógenas transfectadas. Se informa la proteína expresada y los anticuerpos primarios utilizados (WB) fueron: α -AU5 para EV, Rac1 Q61L, Cdc42 Q61L, RhoA Q63L y RhoG Q63L y α -Tubulina como control de carga. Barras de error, S.E.M. t test; ns, no significativo; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, vehículo vs. 1A-116 para cada proteína. La expresión de luciferasa se relativizó al valor de expresión de *renilla* (control de transfección) y los valores informados corresponden a incremento de actividad con respecto a la media de expresión de luciferasa del vector vacío (EV), en unidades arbitrarias (u.a.). Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

El residuo aminoacídico W56 de Rac1 es necesario para los efectos inhibitorios de 1A-116

Como se muestra en el alineamiento de la Figura 3 A, las GTPasas Rac1 y Cdc42 comparten aproximadamente un 70% de homología de secuencia, pero difieren en ciertos residuos claves. En este sentido, Rac1 presenta un triptófano en la posición 56 (W56), mientras que Cdc42 una fenilalanina (F56) (zona sombreada en gris). Debido a que W56 es un residuo clave en la activación de Rac1 por parte de diferentes GEFs (86), se lo utilizó como centro de búsqueda de moléculas inhibitorias de Rac1 en un screening virtual realizado anteriormente en nuestro laboratorio. Teniendo en cuenta esto y buscando evaluar la especificidad de 1A-116 por el sitio W56, llevamos adelante una mutagénesis sitio-dirigida para generar diferentes versiones mutantes de Rac1 y Cdc42: Rac1 W56F, cambiando el W56 por una F; y Cdc42 F56W, cambiando la F56 por un W. Transfectamos células COS-1 con estas construcciones y llevamos adelante un ensayo de activación de SRE-Luc en presencia o ausencia de 1A-116. Como se muestra en la Figura 3 B, 1A-116 inhibió la activación de SRE mediada por Rac1 en un 40%. Sin embargo, al tratar las células transfectadas con la versión mutante Rac1 W56F, 1A-116 perdió sus efectos inhibitorios. Por otro lado, 1A-116 no inhibió la activación de Cdc42. Sin embargo, sí lo hizo al inhibir la activación del mutante Cdc42 F56W. En resumen, estos resultados muestran que el residuo aminoacídico W56 de Rac1 es necesario para los efectos inhibitorios de 1A-116.

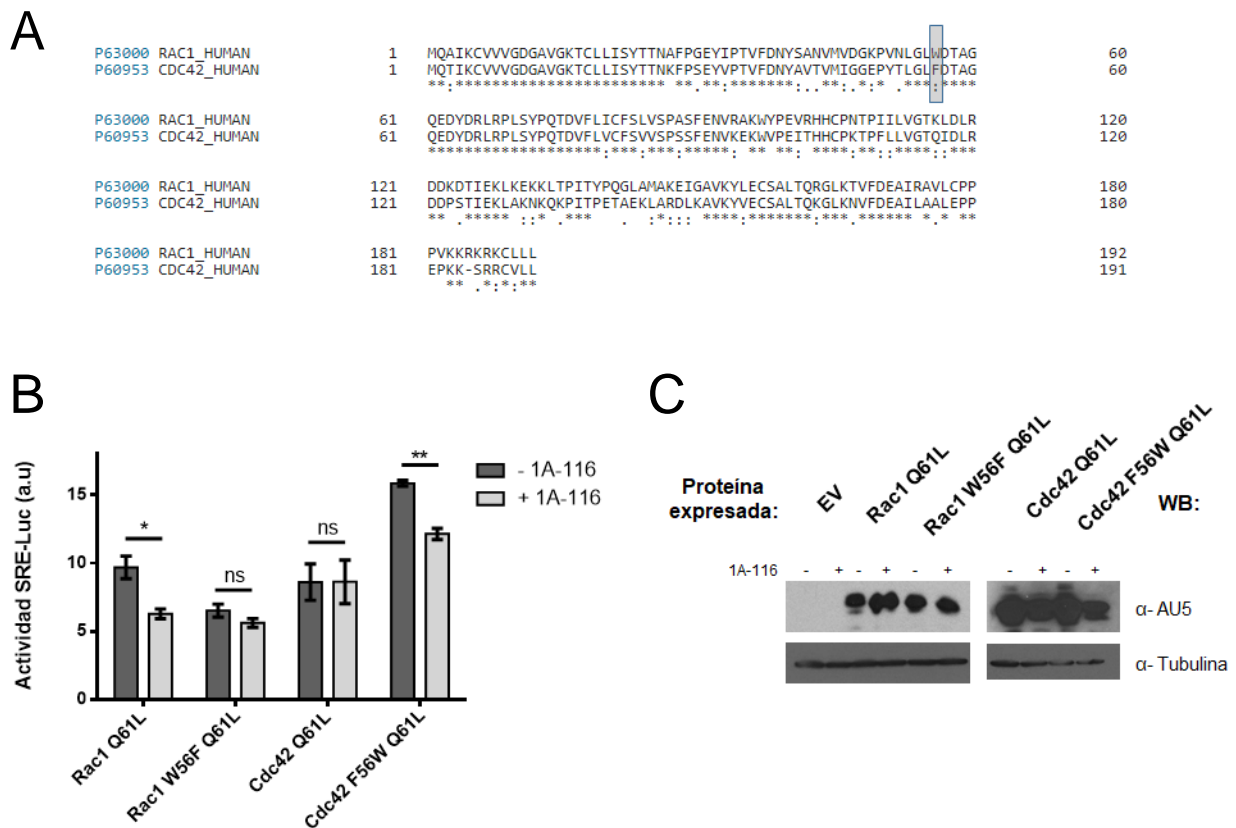


Figura 3: El residuo aminoacídico W56 de Rac1 es necesario para los efectos inhibitorios de 1A-116. A) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las GTPasas Rac1 (Uniprot ID p63000) y Cdc42 (Uniprot ID p60953). La zona sombreada en gris marca la diferencia en el aminoácido 56, residuo clave en la activación de Rac1 por diferentes GEFs. **B)** Se co-transfectaron células COS-1 con versiones activas de Rac1 (Q61L), Cdc42 (Q61L) y los mutantes de Rac1 (W56F Q61L) y Cdc42 (F56W Q61L), junto con los plásmidos reporteros SRE-Luc y *renilla*, se trataron (+ 1A-116, gris claro) o no (-1A-116, gris oscuro) con 1A-116 50 μ M y se midió la actividad luciferasa. **C)** Controles de expresión por western blot de las proteínas exógenas transfectadas. Se informa la proteína expresada y los anticuerpos primarios utilizados (WB) fueron: α -AU5 para EV, Rac1 Q61L, Cdc42 Q61L, Rac1 W56F Q61L, Cdc42 F56W Q61L y α -Tubulina como control de carga. Barras de error, S.E.M. t test; ns, no significativo; * p <0.05; ** p <0.01, vehículo vs. 1A-116 para cada proteína. La expresión de luciferasa se relativizó al valor de expresión de *renilla* (control de transfección) y los valores informados corresponden a un incremento de actividad con respecto a la media de expresión de luciferasa del vector vacío (EV), en unidades arbitrarias (u.a.). Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

1A-116 actúa inhibiendo la actividad de Rac1 a nivel GEFs-Rac1

Para confirmar efectivamente la hipótesis de que 1A-116 inhibe la actividad de Rac1 actuando a nivel de la interacción GEFs-Rac1, llevamos adelante diferentes ensayos de pull-down y un ensayo de diferenciación 3D utilizando queratinocitos humanos expresando versiones activas de diferentes componentes de la vía de señalización de Rac1.

Para el caso de los ensayos de pull-down, utilizamos dos esquemas experimentales diferentes. En primer lugar, transfectamos células COS-1 con diferentes versiones de Rac1: la versión wild type y la de actividad incrementada (Rac1 Q61L). Al cabo de 48 h, lisamos las células y capturamos Rac1 con la construcción proteica GST-PAK1, en presencia o ausencia

de 1A-116. Como se muestra en la Figura 4 A, la presencia de 1A-116 no interfirió con la interacción Rac1-PAK1, ya que los niveles de Rac1-GTP no se vieron alterados. Por otro lado, el segundo esquema experimental involucró la transfección de células COS-1 con Rac1 Q61L, tratando o no con 1A-116 durante 24 h. Luego se generaron los lisados celulares y se llevó adelante el pull-down. En este caso, en el que el ciclo de activación de la proteína estaba en funcionamiento, el tratamiento con 1A-116 *in vitro* provocó un descenso en los niveles de Rac1-GTP (Figura 4 B).

Finalmente, se llevó a cabo un ensayo de diferenciación 3D *in vitro* utilizando líneas celulares de queratinocitos humanos Ker-CT transfectadas establemente con versiones activas de diferentes componentes de la vía de señalización de Rac1: un activador de tipo GEF (Vav2 oncogénico), una versión *fast cycling* de Rac1 con actividad incrementada (Rac1 F28L) y un efector directo de Rac1, constitutivamente activo (PAK1 T423). El ensayo se llevó a cabo cultivando las células durante 11 días en presencia de una matriz extracelular en una membrana tipo *transwell*, tratando o no las células con 1A-116 a concentraciones en el rango nanomolar, renovando el medio de cultivo cada 3 días, aproximadamente. Las células Ker-CT *wild type* creciendo en estas condiciones desarrollaron una arquitectura característica de epidermis estratificada compuesta por queratinocitos basales proliferativos y suprabasales diferenciados, así como un estrato córneo superficial (Figura 4 C, *Wild-type*, panel superior izquierdo), estructura 3D que no sufrió alteración alguna al ser tratado con 1A-116 (Figura 4 C, Control, panel superior derecho). La sobreexpresión estable de diferentes componentes activos de la vía de señalización de Rac1 provocó el desarrollo de hiperplasia y la formación de un epitelio desorganizado e invasivo (Figura 4 C, Vav2 onco, Rac1 F28L, PAK1 T423, columna izquierda). Al tratar estas estructuras organotípicas epiteliales 3D con 1A-116, se logró revertir la hiperplasia mediada por la activación de Vav2 y de Rac1, pero no así la mediada por PAK1 (Figura 4 C, Vav2 onco - Rac1 F28L - PAK1 T423, columna derecha).

En resumen, los ensayos de *pull-down* y de diferenciación 3D de queratinocitos *in vitro* llevados a cabo demuestran efectivamente la hipótesis de que los efectos inhibitorios de 1A-116 se llevan a cabo al nivel de la interacción GEFs-Rac1.

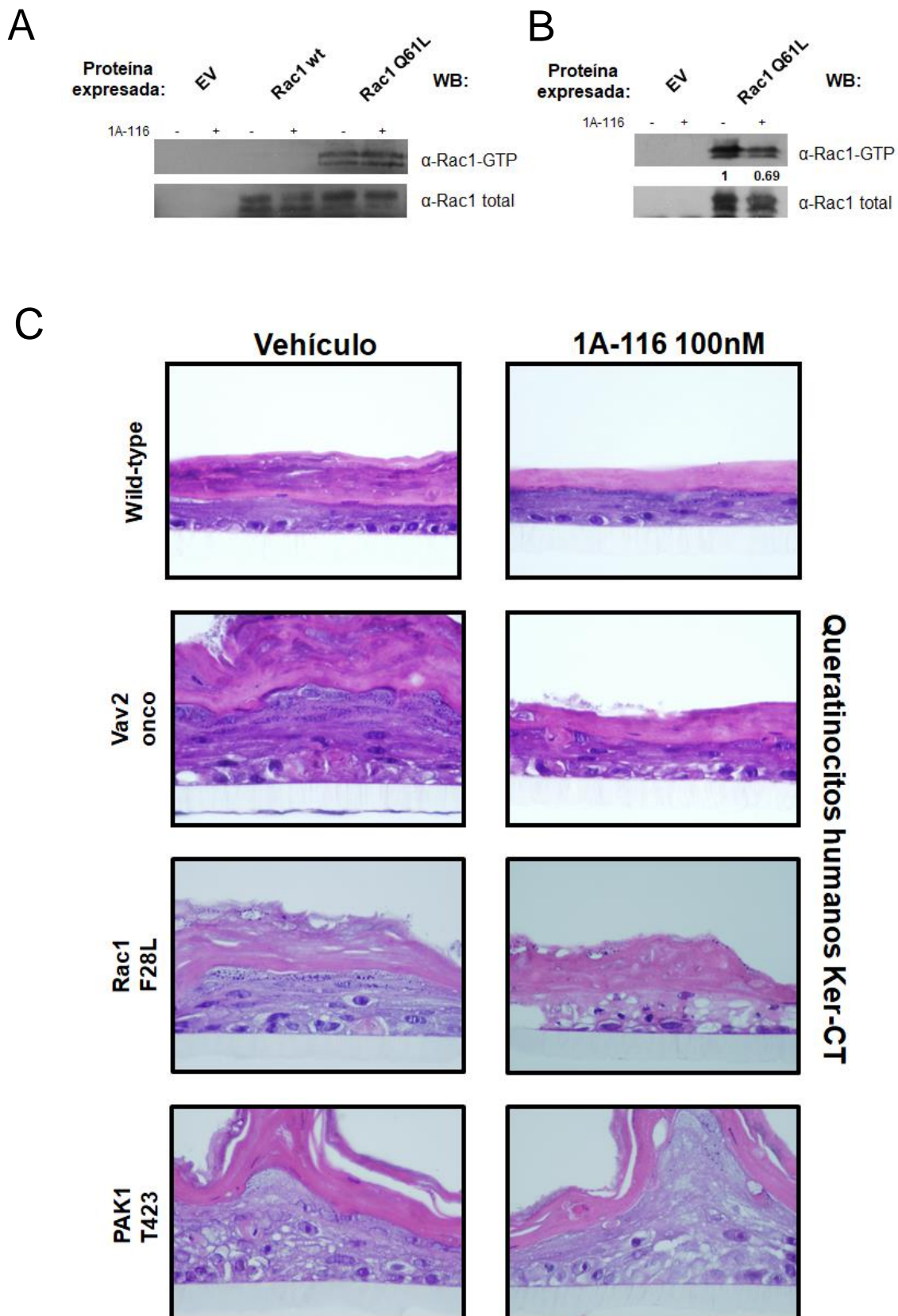


Figura 4: 1A-116 actúa inhibiendo la actividad de Rac1 a nivel GEFs-Rac1. A) Diferentes versiones de Rac1 (*wild type* (Rac1 wt) y Q61L (Rac1 Q61L) expresadas en células COS-1 se precipitaron mediante ensayo de *pull-down* con GST-PAK1, en presencia de vehículo (-) o de 1A-116 200 μM (+). Se expresó también al vector vacío (EV) como control negativo. **B)** Células COS-1 transfectadas Rac1 Q61L fueron tratadas con vehículo (-) o con 1A-116 50 μM (+). Los lisados celulares se precipitaron mediante ensayo de *pull-down* con GST-PAK1

Se informan valores densitométricos (unidades arbitrarias tomando a Rac1 Q61L tratada con vehículo como 1). El análisis mediante western blot se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-Rac1. **C)** Ensayo de diferenciación 3D *in vitro* de queratinocitos humanos Ker-CT y tratados con vehículo (columna izquierda) o 1A-116 100 nM (columna derecha), durante 11 días (renovando el medio de cultivo cada 3 días aproximadamente). Las células Ker-CT utilizadas fueron: Control (*wild type*); Vav2 onco (expresando establemente una versión activada de Vav2); Rac1 F28L (expresando una versión *fast cycling* con actividad incrementada de Rac1) y PAK1 T423 (expresando una versión constitutivamente activa de PAK1). Las estructuras epiteliales formadas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se seccionaron transversalmente y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).

1A-116 inhibe la formación de ruffles y lamelipodios

Para investigar el efecto de 1A-116 sobre los rearrreglos del citoesqueleto inducidos por Rac1, transfectamos células COS-1 con una versión de Rac1 Q61L fusionada en su N-terminal con EGFP. Al cabo de 24 h, subcultivamos y sembramos las células en vidrios cubiertos de poli-lisina y las tratamos o no durante 16 h con 1A-116. Luego, se fijaron y tiñeron con AlexaFluor555-faloidina y DAPI y se analizaron mediante microscopía confocal. En la Figura 5 (vehículo, fila superior) se observa que la expresión transiente de Rac1 Q61L genera la formación de *ruffles* periféricos, que co-localizan con Rac1. Sin embargo, este fenotipo fue inhibido al tratar las células con 1A-116 (Figura 5, 1A-116, fila inferior), mostrando una vez más que este compuesto inhibe procesos celulares regulados por Rac1.

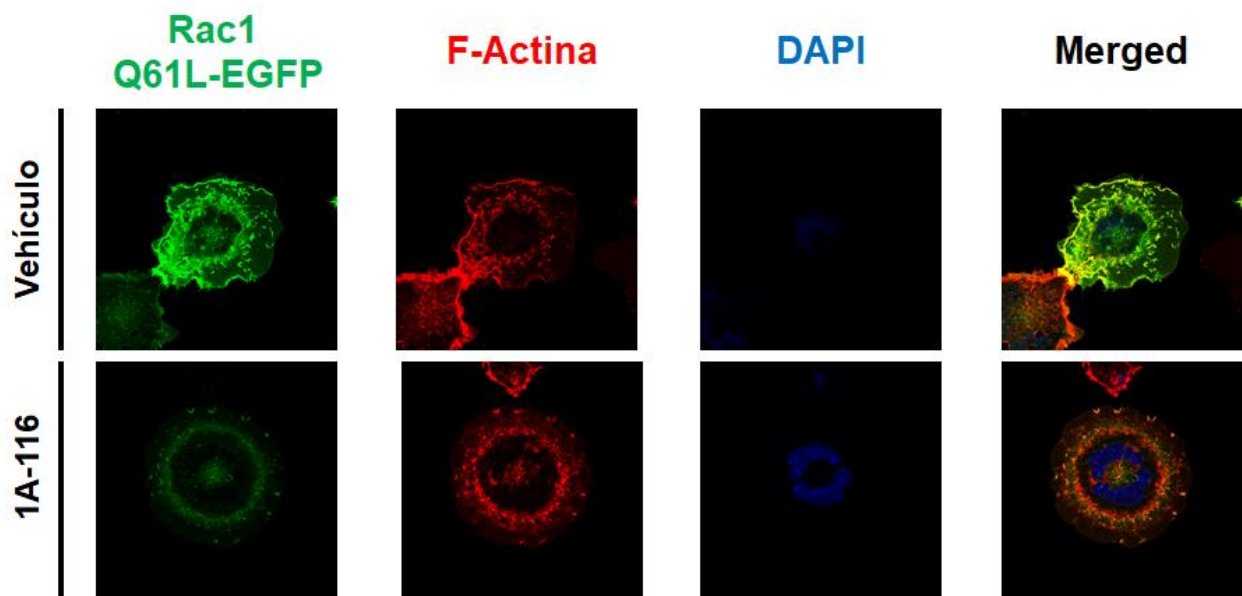


Figura 5: 1A-116 inhibe la formación de ruffles y lamelipodios, procesos celulares regulados por Rac1. Se cultivaron células COS-1 transfectadas con Rac1 Q61L fusionada a EGFP (Rac1 Q61L-EGFP) en vidrios cubiertos de poli-lisina y se las trató o no (vehículo) con 1A-116 50 μ M durante 24 h. Luego de transcurrido el tiempo, se fijaron y tiñeron con AlexaFluor555-faloidina y DAPI (para observar los filamentos de Actina y núcleos, respectivamente) y se observaron mediante microscopía confocal.

Discusión Parcial – Capítulo I

La familia de las Rho GTPasas representa un subgrupo de proteínas de unión a GTP de unos 20-30 kD, pertenecientes a la superfamilia de las proteínas Ras. Se distinguen de éstas debido a la presencia de un dominio GTPasa tipo Rho. Las Rho GTPasas se clasifican en 6 grupos o subfamilias, siendo las subfamilias Rac, Cdc42 y Rho las más caracterizadas estructural y funcionalmente. Estas proteínas actúan como interruptores moleculares al ciclar entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. Es en éste estado unido a GTP dónde las Rho GTPasas llevan adelante sus funciones regulatorias a través de interacciones específicas con proteínas target o efectoras. Más de 50 proteínas efectoras han sido identificadas para Rho, Rac1 y Cdc42, que incluyen serina/treonina kinasas, tirosina kinasas, lipasas, oxidasas y proteínas tipo *scaffold* (112-114).

Las Rho GTPasas controlan una amplia variedad de vías de señalización en las células eucariotas. Debido a su rol en la reorganización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos, las Rho GTPasas regulan procesos dependientes del citoesqueleto, como cambios en la morfología celular, adhesión, migración y en el establecimiento de la polaridad de células epiteliales, regulando la formación de las uniones adherentes y de uniones estrechas.

Además de estas funciones, en la última década se han descrito funciones novedosas para esta proteína. En este sentido, se demostró que Rac1 regula la inducción de mecanismos de respuesta al daño en el ADN en cardiomiocitos (115). Además, en línea con estos resultados, Rac1 es necesario para mantener la integridad vascular y los procesos de angiogénesis (116). Por otro lado, se ha demostrado que Rac1 cumple un papel importante en la captación de glucosa durante el ejercicio, regulando la actividad del transportador GLUT4 (117).

Una gran variedad de tumores presentan sobreactivada la vía de señalización de las Rho GTPasas. Existen al menos tres factores que contribuyen al aumento en la actividad de estas proteínas: alteraciones genéticas, sobreexpresión y alteración en los ciclos de activación.

A diferencia de lo que ocurre con las proteínas de la familia Ras, las alteraciones en los genes que codifican las Rho GTPasas son extremadamente raras. Sin embargo, avances en genómica de secuenciación han permitido caracterizar la mutación RAC1P29S, como una mutación de ganancia de función sumamente relevante en melanoma. De hecho, se considera que esta mutación se comporta como driver en estos pacientes, siendo la tercera mutación más frecuente en melanoma, detrás de BRAF y NRAS (118, 119). Recientemente se ha informado que esta mutación también provoca un aumento en la expresión de PD-L1 en estos pacientes (120). PD-L1 es un supresor del sistema inmune, por lo que RAC1 P29S

podría promover una supresión de la respuesta inmune al tumor. Otro trabajo, en el que se utilizó un enfoque computacional, identificó la misma mutación en cáncer de cabeza y cuello, y en cáncer de endometrio; detectando también una segunda mutación en RAC1, la A159V, principalmente en cánceres de cabeza y cuello (121).

Debido a que Rac1 puede comportarse como un nodo de conexión de la señal de activación de diferentes tipos de receptores celulares, los cambios en la expresión y/o actividad de estos receptores pueden estar relacionados con una sobreactivación de la vía de Rac1. Por ejemplo, el receptor de EGF (EGFR) se encuentra sobreexpresado en múltiples tipos de cáncer, convirtiéndose en un factor de crecimiento importante a la hora de promover la progresión tumoral (122). Su conexión con la vía de Rac1 promueve la proliferación celular y los mecanismos de supervivencia al activarse el eje de señalización Rac1/PAK1/RAF/MEK/ERK y la vía Rac1/quinasa c-Jun (123). Rac1 también activa la cascada de señalización de NF- κ B en respuesta a diversos estímulos, particularmente a citoquinas inflamatorias (113, 124). Por otro lado, las numerosas señales que activan Rac1, estimulan la activación de diferentes proteínas efectoras. Las más conocidas y estudiadas son PAK1, MAPK, NF κ B, la proteína adaptadora NCK/Wave1 y la proteína NADPH oxidasa o p67 phox (125).

La desregulación de la vía de señalización de Rac1 también está involucrada en el desarrollo de un fenotipo tumoral invasivo. Durante el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT), las células pierden su polaridad y sus uniones intercelulares, provocando una remodelación de la matriz extracelular y la adquisición de capacidades migratorias e invasivas (126). La regulación de la polaridad celular, migración e invasión mediada por Rac1 hace que esta GTPasa este asociada a EMT (127). Recientemente se ha demostrado que el eje de señalización PI3K/Akt-Rac1-JNK promueve EMT en adenocarcinoma gástrico (128). Además, PI3K también controla la migración a través de la modulación de EMT mediada por Rac1, potenciando el rol de esta proteína como regulador de la agresividad tumoral y remarcando su rol como potencial blanco terapéutico.

Numerosos estudios demuestran que la desregulación de las vías de señalización de las Rho GTPasas juega un papel importante tanto en la iniciación como en la progresión tumoral. Las evidencias iniciales surgieron al estudiar mutantes constitutivamente activos de Rac1 y RhoA, que resultaron ser esenciales para la transformación maligna inducida por Ras (85). Estudios en modelos murinos refuerzan el rol de Rac1 en la progresión tumoral. Ratones RAC1 KO vieron afectado el desarrollo de cáncer de piel, pulmón y páncreas, inducido por KRAS (129-131). A su vez, la delección o silenciamiento de activadores de tipo GEF de Rac1 como Tiam1 o P-REX1 en modelos murinos provocó la pérdida de un fenotipo tumorigénico

y metastásico en cáncer de mama y piel (132-134).

Las evidencias que relacionan a las Rho GTPasas con cáncer las han convertido en un atractivo blanco terapéutico a nivel molecular, siendo Rac1 y sus activadores de tipo GEF los blancos terapéuticos más prometedores dentro de la familia de Rho GTPasas (135).

La GTPasa Rac1 ha sido blanco de estudio de nuestro laboratorio desde hace ya varios años por su rol en los mecanismos moleculares de progresión tumoral y desarrollo de metástasis. La sobreexpresión de β -GAP, el dominio catalítico de β 2-Chimaerin, inhibió el crecimiento de una línea celular de cáncer de mama, reduciendo su agresividad y su capacidad metastásica (81). Este resultado evidenció la potencial modulación de la vía de Rac1 como blanco terapéutico en cáncer.

En este contexto, se llevó adelante una búsqueda de compuestos con alta afinidad y especificidad por el sitio de interacción de Rac1 con sus activadores. A través de un screening virtual basado en docking, se utilizó la información aportada por la estructura cristalizada de Rac1 en complejo con su activador de tipo GEF Tiam1 (86, 87). Se había demostrado que el residuo aminoacídico W56 de Rac1 resultaba ser imprescindible para que una serie de GEFs pudieran reconocer esta proteína y activarla (86, 88). Por esta razón, se eligió a este sitio como centro de búsqueda de potenciales inhibidores de Rac1. Para ello, se utilizó una base de datos pública de 200.000 compuestos con características "drug-like" (90), permitiendo identificar a ZINC69391, como un compuesto con actividad anti-tumoral en 6 líneas celulares transformadas: F3II de carcinoma mamario murino, MCF7 de carcinoma mamario humano, 3LL de carcinoma de pulmón de células no pequeñas murinas, H125 de carcinoma de pulmón humanas, LN229 glioblastoma multiforme humano y PC3 de adenocarcinoma de próstata humano.

El diseño racional de análogos de ZINC69391 y su posterior evaluación permitió identificar al análogo 1A-116 como un inhibidor de Rac1 más potente y específico, tanto in vitro como in vivo. Los resultados previos obtenidos con 1A-116 mostraron que este compuesto posee efectos inhibitorios en varias estirpes tumorales. Pudimos demostrar su efecto anti-metastásico en cáncer de mama (93) y pro-apoptótico y anti-invasivo en glioblastoma (92), produciendo un beneficio en la supervivencia de ratones tratados portadores de tumores intracraneales. Además, 1A-116 indujo apoptosis selectivamente en células de leucemia mieloide aguda derivadas de pacientes sin efecto alguno sobre células mononucleares normales (91). Los estudios preliminares de toxicología arrojaron resultados alentadores para este compuesto.

Con el objetivo de realizar una descripción detallada del funcionamiento de 1A-116 y

comprender aún más sus efectos inhibitorios, llevamos adelante un análisis farmacodinámico de la interacción del compuesto con diferentes actores dentro de la vía de señalización de Rac1.

Utilizamos un sistema reportero bioluminiscente utilizado ampliamente para estudiar la regulación génica en respuesta a diferentes receptores de membrana y proteínas de señalización. El sistema reportero de la luciferasa fue elegido debido a su sensibilidad, amplio rango dinámico y falta de actividad endógena. Se utilizó al elemento respondedor de suero (SRE o Serum Response Element) como promotor de la expresión de luciferasa debido a que se ha demostrado que miembros de la familia de Rho GTPasas, como Rac1, Rho y Cdc42 son capaces de regular la actividad transcripcional de este promotor (136).

En primer lugar evaluamos un grupo de diferentes activadores de tipo GEF con actividad constitutiva. Se eligieron los 3 miembros de la familia Vav (Vav1, Vav2 y Vav3), Tiam1 y DBL. Debido su papel catalítico en la estimulación de Rac1 y la presencia de mutaciones en tumores, estos GEFs se han considerado como posibles blancos farmacológicos. Pudimos observar que el tratamiento con 1A-116 logró inhibir la actividad de estos GEFs. El efecto sobre Tiam1 confirma resultados previos en los que observamos su inhibición por parte de 1A-116 utilizando un método menos sensible y específico, como precipitación de afinidad.

Por otro lado, estudiamos también un grupo de diferentes GTPasas con actividad aumentada buscando evaluar cuáles podrían estar siendo moduladas por 1A-116. Por resultados previos de precipitación de afinidad, sabíamos que este compuesto era capaz de inhibir a Rac1 pero no a Cdc42. Esta es una proteína íntimamente relacionada con Rac1, que comparte un alto porcentaje de homología de secuencia aminoacídica y proteínas efectoras (113, 137). Sin embargo, los procesos celulares regulados por Rac1 y Cdc42 desencadenan cambios morfológicos diferentes en la membrana celular, al inducir la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente (138, 139). En este trabajo confirmamos nuevamente que 1A-116 inhibe la actividad de Rac1 pero no la de Cdc42 (ahora con un método de detección mucho más sensible y específico), probando además que este compuesto también es capaz de inhibir la actividad de otras GTPasas como RhoA y RhoG. Estas GTPasas también presentan roles importantes en la progresión tumoral. RhoA se encuentra sobreexpresada en varios tipos tumorales, como cáncer de mama, próstata o hígado, dónde se comportaría como marcador desfavorable de progresión. A su vez, la sobreexpresión de RhoG se comportaría de igual manera en cáncer colorectal y de riñón. (Human Protein Atlas disponible de www.proteinatlas.org).

Estudios de estructura-función del mecanismo de activación de Rac1 por diferentes

GEFs han permitido caracterizar en detalle cómo esta GTPasa es regulada por sus activadores. Se ha postulado que en primer lugar el GEF interacciona con una porción conformacionalmente rígida de Rac1, conformada principalmente por las cadenas $\beta 2$ - $\beta 3$ (entre el *switch* 1 y 2) y por los residuos 65-74 del *switch* 2, de manera de otorgarle suficiente energía de unión, para que luego se altere la conformación del *switch* 1 y la porción faltante del *switch* 2, desestabilizando la unión de GDP, y permitiendo el intercambio por GTP (86, 87).

Lo interesante de la inhibición mediada por 1A-116 de Rac1, RhoA y RhoG (pero no de Cdc42) es que al realizar un alineamiento de secuencias aminoacídicas de estas cuatro proteínas, observamos que tanto Rac1 como RhoA y RhoG comparten un triptofano en posición 56 y que Cdc42 posee una fenilalanina en este sitio. Como se mencionó anteriormente, el W56 de Rac1 resulta clave para su activación por diferentes GEFs. Por esta razón, hipotetizando que este aminoácido cumplía un papel importante para que 1A-116 llevara adelante sus efectos inhibitorios, realizamos un estudio de mutagénesis dirigida sobre Rac1 y Cdc42, intercambiando los aminoácidos en posición 56 de ambas proteínas. La generación de estos mutantes nos permitió demostrar que 1A-116 pierde sus efectos inhibitorios sobre Rac1, ganándolos sobre Cdc42, en función de la ausencia o presencia del W56, respectivamente. Esto confirma efectivamente que el aminoácido W56 resulta imprescindible para que 1A-116 muestre sus efectos inhibitorios.

La estructura cristalizada de Rac1 formando un complejo con Tiam1 demostró que el W56 genera interacciones de tipo puente de hidrógeno con la histidina 1178 de este GEF, estableciendo numerosas interacciones de van der Waals con los aminoácidos cercanos. La sustitución del W56 por fenilalanina (F), provoca una menor ocupación del bolsillo hidrofóbico de Rac1 (debido al menor tamaño de F), con la consecuente pérdida de las interacciones con los aminoácidos del GEF que debe posicionarse. De esta manera, se reduce la afinidad de unión del GEF y la respuesta a su activación. En este sentido y tomando en cuenta estos resultados, postulamos que al interferir con estas interacciones, 1A-116 impide el correcto posicionamiento del GEF, inhibiendo la activación de la proteína.

Como ya se mencionó, 1A-116 fue desarrollado racionalmente a partir de la estructura del compuesto líder ZINC69391 con el objetivo de interferir con la interacción GEF-Rac1. En resultados previos obtenidos por nuestro grupo pudimos demostrar, a través de métodos de precipitación de afinidad, que tanto ZINC69391 como 1A-116 eran capaces de interferir la interacción de Tiam1, P-REX1 y DOCK180 con Rac1 (92, 93). En este trabajo, nos propusimos confirmar que la inhibición mediada por 1A-116 se daba efectivamente a nivel de GEF-Rac1. En este sentido, cuando evaluamos la interacción de Rac1 con su efector en un

ensayo libre de células, 1A-116 no fue capaz de alterar esta interacción. Sin embargo, cuando se trataron células en cultivo, en las que el ciclo de activación de la GTPasa Rac1 se encontraba en funcionamiento, el inhibidor logró disminuir los niveles de activación de Rac1.

Siguiendo esta línea, pudimos demostrar fehacientemente el mecanismo de inhibición GEF-Rac1 al utilizar modelos celulares de crecimiento en 3D de queratinocitos. Los modelos utilizados fueron células KER-CT humanas transfectadas establemente con diferentes integrantes de la vía de Rac1. Resultados previos demostraban que la sobreexpresión de los diferentes componentes de la vía de Rac1 provocaba la adquisición de un fenotipo hiperplásico, induciendo la formación de un epitelio desorganizado e invasivo. En este caso, el inhibidor 1A-116 fue capaz de revertir la hiperplasia mediada por Vav2 y por Rac1, pero no por PAK1, confirmando una vez más que los efectos inhibitorios de 1A-116 se llevan a cabo al interferir con la interacción GEF-Rac1. La concentración de 100 nM utilizada da muestras del potente efecto que 1A-116 mostró en este ensayo funcional. Cabe mencionar que este tipo de moléculas no suelen mostrar efectos biológicos a concentraciones tan bajas.

Como se mencionó anteriormente, la actividad de Rac1 regula la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de ruffles y lamelipodios. Dado que estos eventos biológicos juegan un papel importante en la invasión y metástasis, demostramos que la inhibición de Rac1, mediada por 1A-116, es capaz de inhibir la formación de estas extensiones citoplasmáticas.

En resumen, 1A-116 es un inhibidor de la actividad de Rac1, RhoA, RhoG, que interfiere con la activación mediada por diferentes GEFs, como Vav1, Vav2, Vav3, Tiam1 y DBL. Los efectos inhibitorios de este compuesto dependen, en gran medida, de la presencia del aminoácido W56, que le otorga especificidad frente a otras GTPasas. Sumado a sus efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos probados en resultados previos, 1A-116 fue capaz de revertir la hiperplasia de queratinocitos humanos mediada por Vav2 y Rac1 y de inhibir la reorganización del citoesqueleto de actina, evento clave para la adquisición de un fenotipo invasivo y metastásico.

Conclusiones Parciales – Capítulo I

- 1A-116 actúa inhibiendo la actividad de Rac1 a nivel GEFs-Rac1 y no Rac1-PAK1.
- El residuo aminoacídico W56 de Rac1 es necesario para los efectos inhibitorios de 1A-116.
- 1A-116 inhibe la activación de SRE mediada por los GEFs Vav1, Vav2, Vav3, Tiam1 y DBL.
- 1A-116 inhibe la activación de SRE mediada por Rac1/RhoA-G, pero no por Cdc42.
- 1A-116 inhibe la formación de ruffles y lamelipodios, procesos celulares regulados por Rac1.

CAPITULO II - Análisis de los perfiles de
expresión génica de la vía de
señalización de Rac1 en muestras de
pacientes de cáncer de mama

Las pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras son proteínas que funcionan como interruptores moleculares en un gran número de vías de señalización. Dentro de esta superfamilia se encuentran las proteínas Rho (Ras homologous). Las Rho GTPasas adoptan diferentes estados conformacionales en respuesta a la unión de GDP o GTP. Sólo en el estado activo unido a GTP, estas proteínas son capaces de unirse y activar a sus proteínas efectoras. La actividad de las Rho GTPasas está estrictamente regulada a fin de estimular local y temporalmente a diferentes efectores celulares. Hasta el momento se conocen tres grupos de proteínas que regulan a las Rho GTPasas: factores intercambiadores de guanina (GEFs o *Guanosine Exchange Factors*), que catalizan la liberación del GDP y la posterior incorporación de GTP; proteínas activadoras de GTPasas (GAPs o *GTPase activating proteins*), que son una familia de proteínas reguladoras cuyos miembros pueden unirse a las proteínas G activadas y estimular su actividad GTPasa, terminando el evento de señalización; e inhibidores de disociación de guanina (GDIs o *Guanine dissociation inhibitors*), que regulan la reacción de intercambio GDP/GTP de las proteínas Rho al inhibir la disociación del GDP de ellas, reteniéndolas en un estado inactivo en el citosol.

Las Rho GTPasas tienen un rol central en la regulación de diversos procesos celulares y su alteración o desbalance puede ser la causa molecular de diversas enfermedades, incluyendo al cáncer. La regulación positiva de Rac1 se debe mayormente a alteraciones de sus proteínas reguladoras. En este aspecto, muchos GEFs presentan un rol relevante en cáncer como TRION, TIAM1, la familia de proteínas VAV, P-Rex1, la familia de proteínas DOCK, entre otros (140-143). También se ha reportado el rol de las proteínas GAP en la progresión tumoral, sugiriendo su participación como una nueva clase de genes supresores de tumores. La evidencia indica que la inactivación de varios miembros de la familia GAP representa un mecanismo importante y alternativo para sobreactivar las proteínas Rho y sus efectores río abajo. Este es el caso de β 2-quimerina (CHN2), un Rac1-GAP cuya expresión se encuentra significativamente disminuida en tumores mamarios (144).

En los últimos años, la vía de señalización de Rac1 ha sido señalada como potencial target molecular debido a su papel crítico en la progresión tumoral y la resistencia adquirida en varios tipos tumorales. Conociendo la importancia que ha cobrado, decidimos realizar un análisis de expresión de los diferentes componentes de la vía en los diferentes niveles del ciclo de activación de Rac1, utilizando grupos de datos provenientes de muestras de pacientes de cáncer de mama con seguimiento clínico, obtenidos de repositorios públicos como el *Gene Expression Omnibus* (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) o cBioportal (<http://www.cbioportal.org>). De esta manera, analizando los niveles de expresión de una serie de genes seleccionados, nos propusimos encontrar miembros de la vía de Rac1 que puedan comportarse como potenciales biomarcadores de respuesta en cáncer de mama.

Análisis de la expresión génica de diferentes componentes de la vía de señalización de Rac1 en muestras de pacientes de cáncer de mama

El objetivo general de este trabajo consistió en estudiar el fenómeno de resistencia a terapias endócrinas en cáncer de mama, haciendo hincapié en el rol de la GTPasa Rac1 como componente importante en este fenotipo. Por esta razón decidimos empezar analizando el *status* de expresión de diferentes componentes de la vía de señalización de Rac1 en biopsias de pacientes con cáncer de mama.

En primer lugar, analizamos un set de datos de 104 biopsias de cáncer de mama y 17 de tejido mamario normal (set de datos GSE42568, Tabla 1). Las pacientes presentaban una edad de entre 31 y 89 años al momento del diagnóstico (edad media= 58 años), siendo 27 menores de 50 años y 76 mayores de 50 años. Del total de pacientes, 67 eran ER positivo, 34 ER negativo y de 3 no se contaba con la información.

Tabla 1: Características clínico-patológicas de las biopsias de GSE42568 analizadas.

GSE42568			
		Número	%
Edad al diagnóstico	< 50	27	26.2
	> 50	76	73.8
ER status	+	67	64.4
	-	34	32.7
	n/d	3	2.9
Grado	1	11	10.6
	2	40	38.5
	3	53	51.0
Tamaño	<2 cm	18	17.3
	2-5 cm	83	79.8
	>5cm	3	2.9

Los integrantes de la vía de señalización de Rac1 estudiados se dividieron en 4 grupos de acuerdo a la función que cumplen en el ciclo de activación de esta GTPasa. Así, evaluamos el grupo de activadores de tipo GEF, las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), *RAC1* (como nodo central de la vía) y *PAK1* (como efector directo) (Tabla 2).

Tabla 2: Lista de genes evaluados, clasificados de acuerdo a la función en la vía de señalización de Rac1.

Componente Vía de Señalización RAC1	Gen
GEF	<i>TIAM1</i>
	<i>VAV3</i>
	<i>TRION</i>
	<i>ARHGEF2</i>
GAP	<i>RAC1</i>
	<i>RALBP1</i>
	<i>CHN2</i>
	<i>ARHGAP9</i>
	<i>ARHGAP22</i>
EFECTOR	<i>SRGAP2</i>
	<i>PAK1</i>

Tomando los datos de expresión génica del set de datos GSE42568, evaluamos los niveles de expresión de mRNA de los diferentes genes en 3 grupos de muestras: tejido normal (n=17), cáncer de mama ER positivo (n=67) y cáncer de mama ER negativo (n=34). En primer lugar, como se observa en la Figura 1 A (Rac1 GAPs), *RALBP1* fue el único GAP en el que se encontraron diferencias significativas de expresión con respecto al tejido normal. Tanto en pacientes ER positivo como ER negativo la expresión de mRNA de este gen se encuentra disminuida en este set de pacientes.

De igual manera, analizando la expresión génica de los genes del grupo GEF, pudimos observar diferencias significativas con respecto al tejido normal en varias de ellas (Figura 1 B). Tanto en el grupo de las pacientes ER positivo como las ER negativo, los genes *TIAM1*, *VAV3* y *TRION* mostraron diferencias con respecto al tejido normal. Estos genes se encuentran sobreexpresados en ER positivo. Cabe destacar que en pacientes ER negativo, la expresión de *VAV3* se encuentra disminuida.

Con respecto a *RAC1*, las pacientes ER positivo no mostraron diferencias de expresión con respecto al tejido normal. En cambio, la expresión de este gen en las pacientes ER negativo se encontraba disminuida (Figura 1 C). En el caso de *PAK1*, este gen se encuentra sobreexpresado con respecto al tejido normal en ambos grupos de pacientes de cáncer de mama (Figura 1 D).

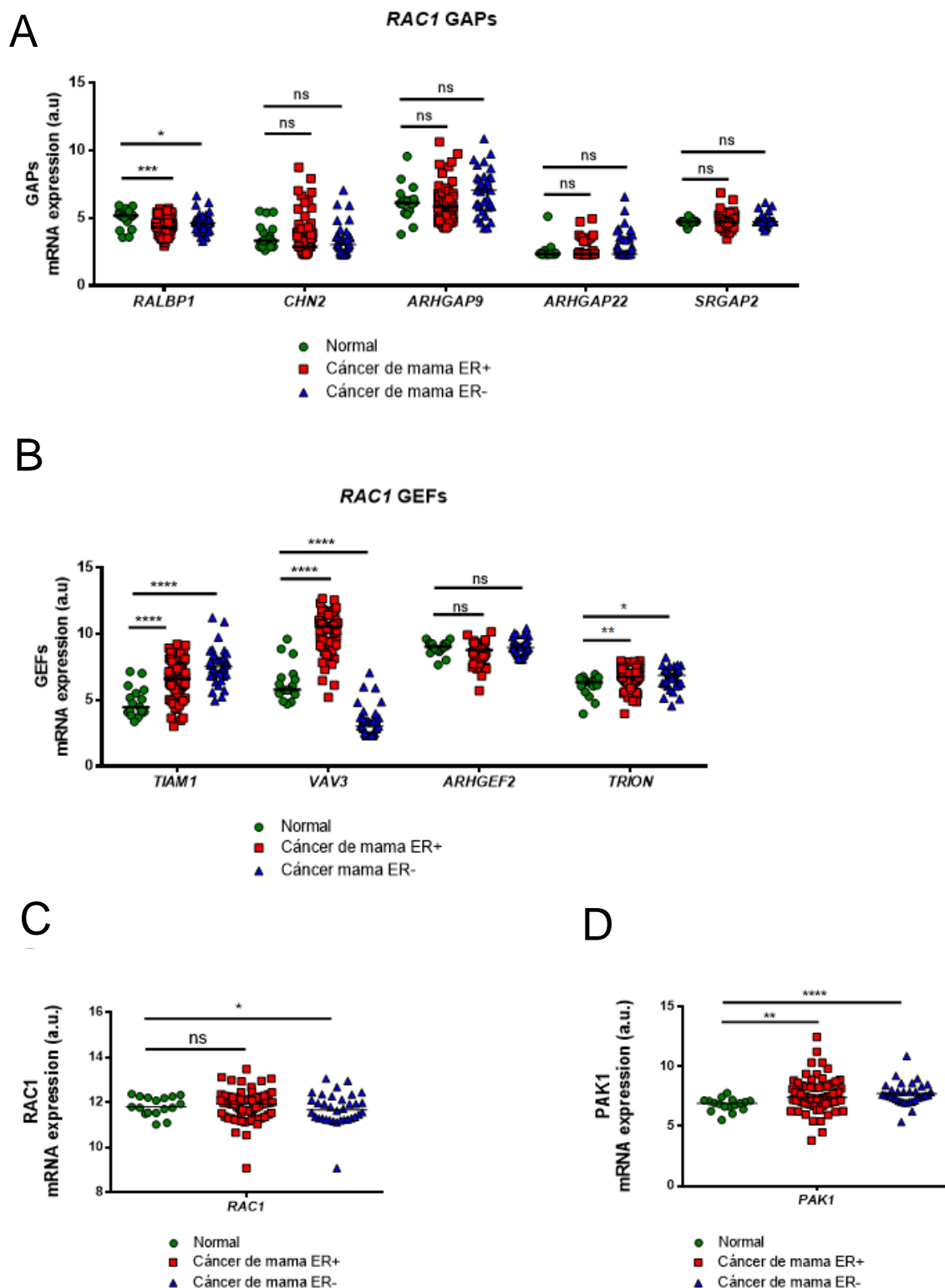


Figura 1: Comparación de los niveles de expresión de diferentes componentes de la vía de señalización de Rac1 en tejido normal y tumoral, utilizando el set de datos GSE42568, del GEO NCBI (Normal, n=17; Cáncer de mama ER positivo, n=67; Cáncer de mama ER negativo, n=34), y la plataforma GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Se compararon los genes de **A)** proteínas activadoras de GTPasas (Rac1 GAPs) (*RALBP1*, *CHN2*, *ARHGAP9*, *ARHGAP22* y *SRGAP2*, **B)** activadores de tipo GEF (Rac1 GEFs) (*TIAM1*, *VAV3*, *TRION* y *ARHGEF2*) **C)** *RAC1* y **D)** *PAK1*. Mediana. ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test; ns, diferencias no significativas; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 vs. Tejido normal. u.a, unidades arbitrarias.

Asociación entre la expresión de genes de la vía de Rac1 y la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama

Teniendo en cuenta los resultados de la Figura 1, decidimos evaluar el potencial valor predictivo de los genes que presentaban diferencias de expresión con respecto al tejido normal, con el objetivo de encontrar posibles biomarcadores de respuesta en cáncer de mama. En este sentido, determinamos valores de corte para RALBP1, TIAM1, VAV3, TRION y PAK1, categorizando a las pacientes de acuerdo a la baja o alta expresión de estos marcadores.

Utilizamos el set de datos del METABRIC de tumores primarios de mama, con seguimiento clínico a largo plazo (108) (Tabla 3).

Tabla 3: Características clínico-patológicas de las biopsias de METABRIC analizadas.

METABRIC			
		Número	%
Edad al diagnóstico	< 50	403	27.2
	> 50	1081	72.8
ER status	+	1078	85.1
	TN	189	14.9
Grado	1	387	34.8
	2	625	56.3
	3	99	8.9
Tamaño	<2 cm	491	33.3
	2-5 cm	903	61.3
	>5cm	79	5.4

El esquema general del estudio realizado se muestra en la Figura 2. En este sentido, del total de muestras contenidas en el METABRIC (n=2509), seleccionamos aquellas que poseían datos de supervivencia global (n=1484). A su vez, dividimos estos pacientes de acuerdo al *status* hormonal en 2 grupos: ER positivo (n=1078) y triple negativos (n=189). El grupo de las pacientes ER positivo se dividió a su vez de acuerdo a si habían recibido (n=521) o no (n=292) terapia endócrina. De todos los grupos realizamos análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, según la baja (LOW) o alta (HIGH) expresión del gen, de acuerdo al punto de corte calculado.

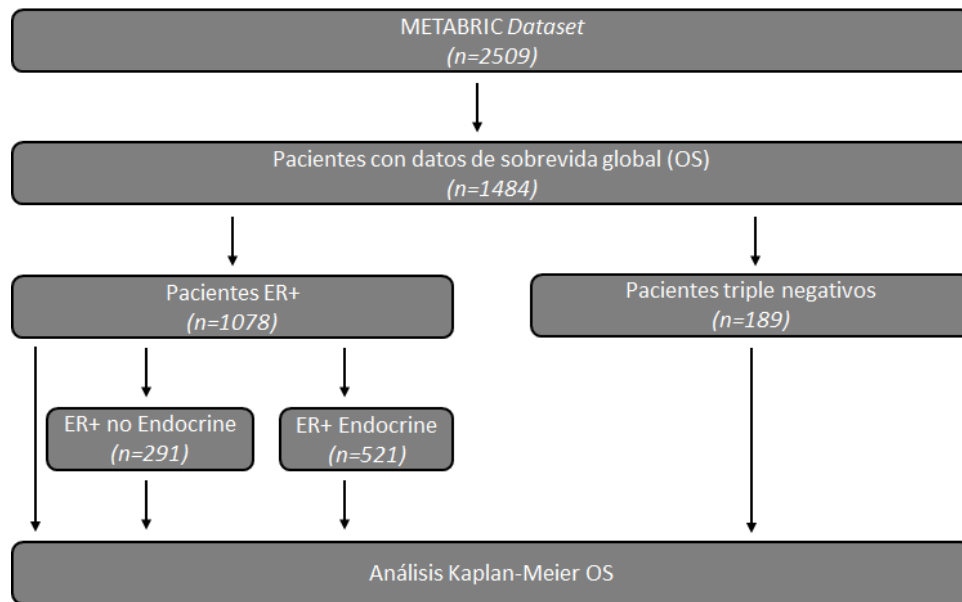


Figura 2: Descripción esquemática del estudio realizado tomando los datos de expresión del set METABRIC.

En primer lugar, evaluamos las implicancias de la baja (LOW) o alta (HIGH) expresión de los genes seleccionados en la supervivencia global de los grupos triple negativo y ER positivo. Para esto, primero evaluamos los niveles de expresión de los diferentes genes en estos grupos. Como se muestra en la Figura 3, sólo *VAV3* mostró diferencias entre estos grupos. En el resto de los genes, no se encontraron diferencias de expresión entre las pacientes triple negativo y ER positivo. Además, en ninguno de los dos grupos se encontraron diferencias en la supervivencia global, en función de la baja o alta expresión de los genes evaluados (Figura 4).

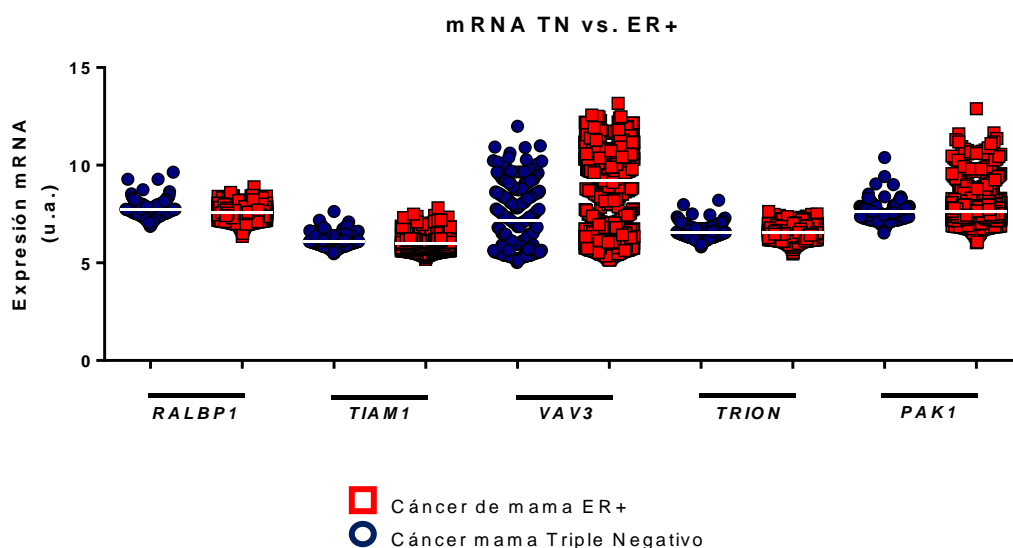


Figura 3: Comparación de los niveles de expresión de mRNA de diferentes componentes de la vía de señalización de Rac1 entre pacientes TN y ER positivo en pacientes de METABRIC. Se muestra la mediana de expresión en blanco.

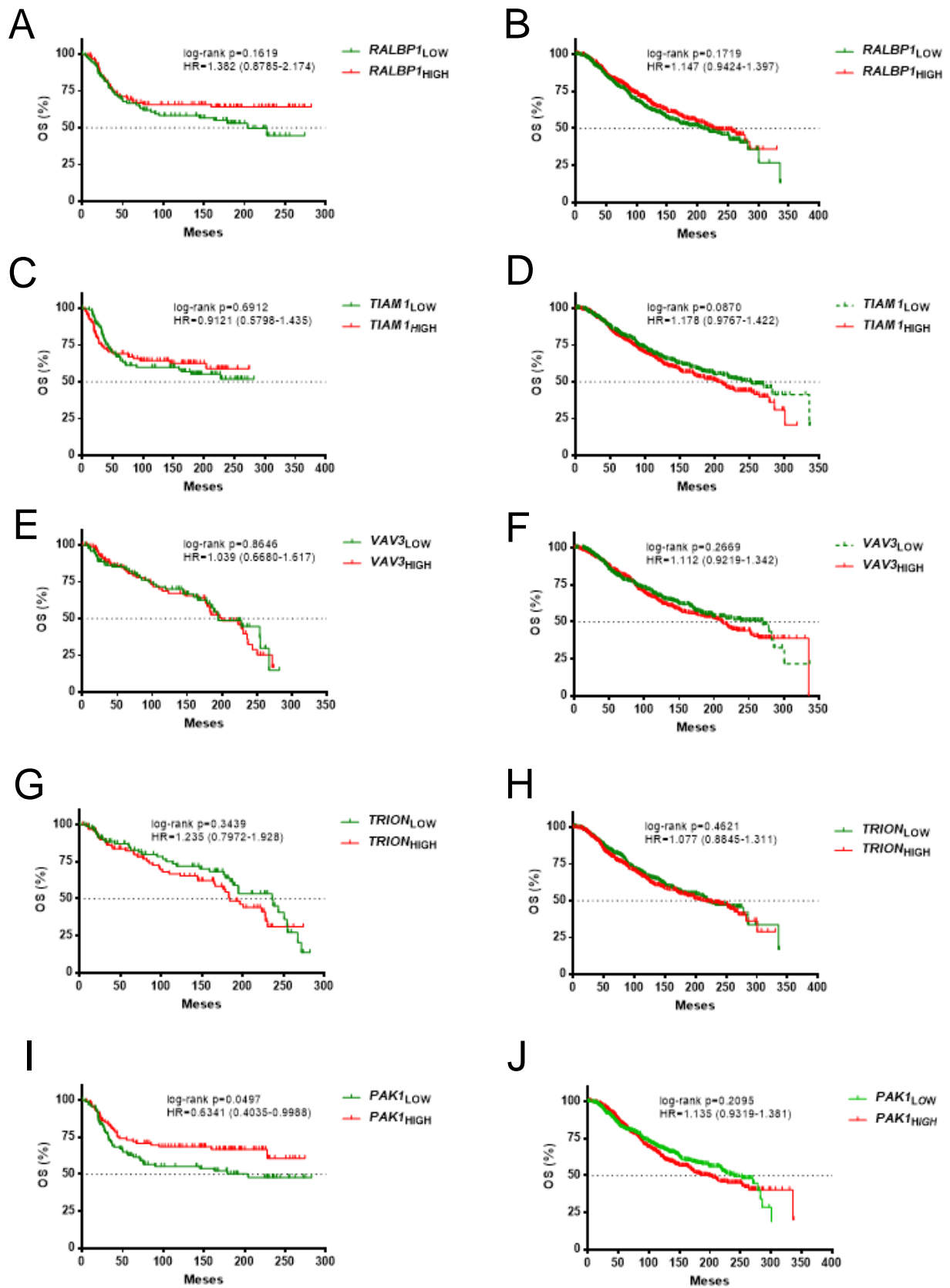


Figura 4: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier sobre pacientes de cáncer de mama. Se muestra el porcentaje de supervivencia global (OS) de pacientes de cáncer de mama. La columna izquierda muestra el análisis sobre pacientes triple negativos y la derecha el análisis sobre pacientes ER positivo (sin discriminar el tratamiento recibido). Las pacientes fueron estratificadas de acuerdo a la baja (LOW, verde) o alta (HIGH, rojo) expresión de

RALBP1 (A-B), TIAM1 (C-D), VAV3 (E-F) TRION (G-H) y PAK1 (I-J) en METABRIC. Ninguna de las curvas muestra diferencias significativas.

La expresión de genes de la vía de Rac1 como potenciales marcadores de respuesta al tratamiento endócrino

Analizamos los diferentes genes propuestos en los grupos de pacientes ER positivo, tratados o no con terapia endócrina. Como se muestra en la Figura 5, la expresión disminuida de *RALBP1* (*RALBP1_{LOW}*) no muestra correlación con un mal pronóstico tanto en las pacientes ER positivas no tratadas (Figura 5 A) o sí con terapia endócrina (Figura 5 B).

Al analizar las curvas de supervivencia de los diferentes GEFs, observamos que la alta expresión de *TIAM1* (*TIAM1_{HIGH}*), *VAV3* (*VAV3_{HIGH}*) y *TRION* (*TRION_{HIGH}*) no correlacionan con un peor pronóstico en pacientes ER positivos no tratados con terapia endócrina (Figura 6 A-C-E, respectivamente). Sin embargo, al analizar aquellas pacientes que recibieron este tipo de tratamiento, la alta expresión de *TIAM1* y *VAV3* correlaciona significativamente con un peor pronóstico, siendo la mediana de supervivencia de este grupo significativamente menor (Figura 6 B-D, respectivamente). Cabe destacar que la alta expresión de *TRION* (*TRION_{HIGH}*) no muestra correlación con un peor pronóstico en las pacientes tratadas (Figura 6 F).

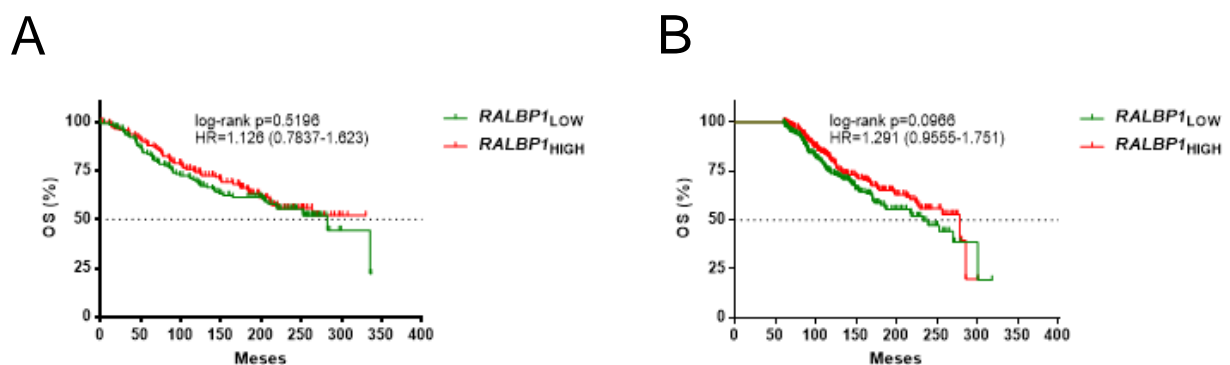


Figura 5: RALBP1 no correlaciona con un peor pronóstico en pacientes de cáncer de mama. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando el porcentaje de supervivencia global (OS) de pacientes de cáncer de mama estratificados de acuerdo a la baja (LOW, verde) o alta (HIGH, rojo) expresión de RALBP1 en METABRIC. A) Pacientes ER positivo no tratados con terapia endócrina (n=291) log-rank p=0.5196; HR=1.126; IC 95%: 0.7837-1.623, (RALBP1_{LOW} vs. RALBP1_{HIGH}). B) Pacientes ER positivo tratados con terapia endócrina (n=521), log-rank p=0.0966; HR=1.291; IC 95%: 0.9555-1.751, (RALBP1_{LOW} vs. RALBP1_{HIGH}).

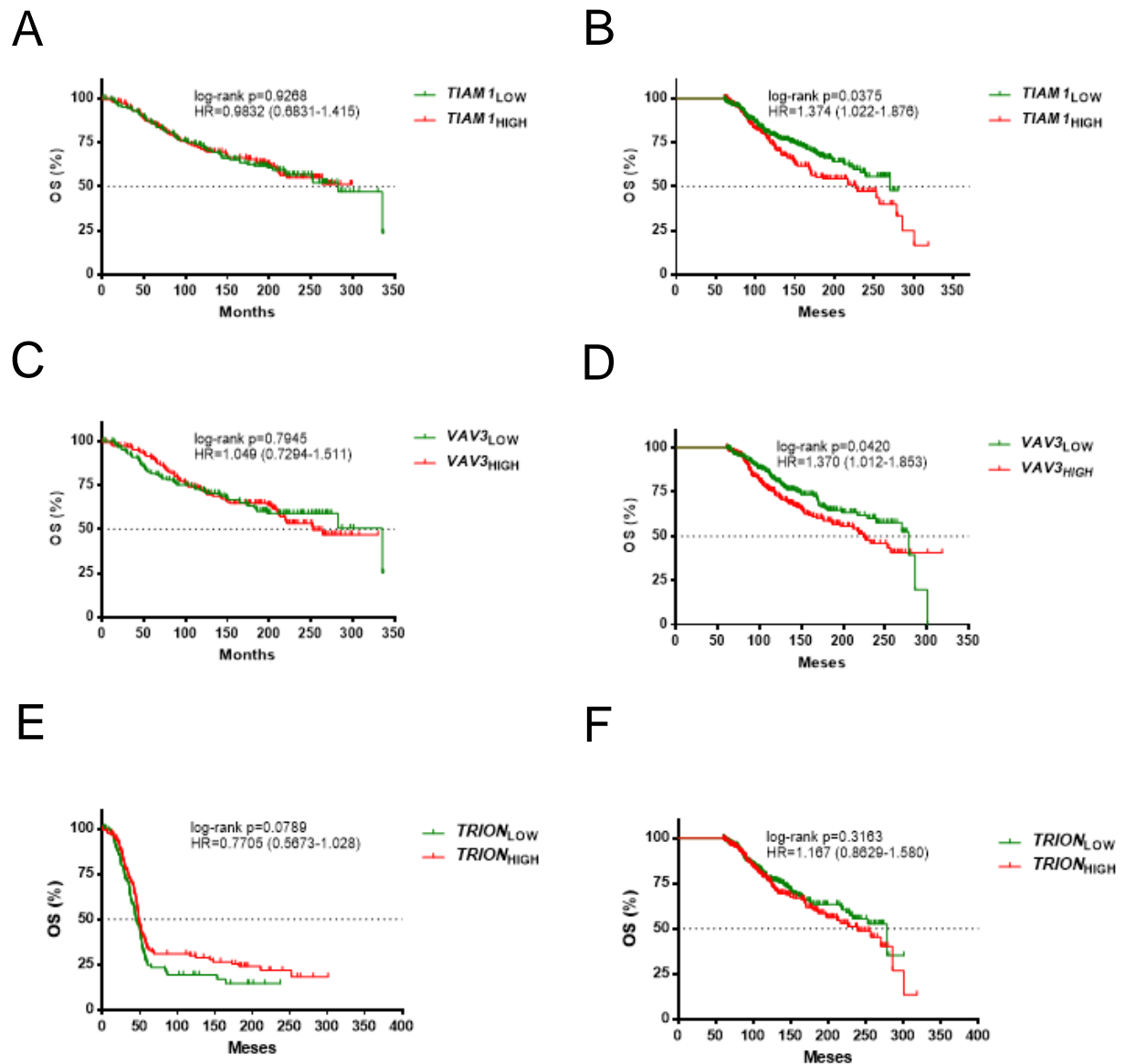


Figura 6: La alta expresión de TIAM1 Y VAV3 correlacionan con un peor pronóstico en pacientes de cáncer de mama ER positivo tratados con terapia endócrina. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando el porcentaje de supervivencia global (OS) de pacientes de cáncer de mama estratificados de acuerdo a la baja (LOW, verde) o alta (HIGH, rojo) expresión de TIAM1 (A-B), VAV3 (C-D) y TRION (E-F) en METABRIC. **A-C-E)** Pacientes ER positivo no tratados con terapia endócrina (n=291); TIAM1: log-rank p=0.9268; HR=0.9832; IC 95%: 0.6831-1.415 (TIAM1_{LOW} vs. TIAM1_{HIGH}). VAV3: log-rank p=0.7945; HR=1.049; IC 95%: 0.7294-1.511 (VAV3_{LOW} vs. VAV3_{HIGH}). TRION: log-rank p=0.0789; HR=0.7705; IC 95%: 0.5673-1.028 (TRION_{LOW} vs. TRION_{HIGH}). **B-D-F)** Pacientes ER positivo tratados con terapia endócrina (n=521); TIAM1: log-rank p=0.0375; HR=1.374; IC 95%: 1.022-1.876 (TIAM1_{LOW} vs. TIAM1_{HIGH}). VAV3: log-rank p=0.0420; HR=1.370; IC 95%: 1.012-1.853 (VAV3_{LOW} vs. VAV3_{HIGH}). TRION: log-rank p=0.3163; HR=1.167; IC 95%: 0.8629-1.580 (TRION_{LOW} vs. TRION_{HIGH}).

Al llevar adelante el análisis de las curvas de supervivencia evaluando la expresión de *PAK1*, demostramos que la alta expresión de este gen (*PAK1_{HIGH}*) no correlaciona con un peor pronóstico en el grupo de pacientes ER positivo no tratados con terapia endócrina (Figura 7 A), pero sí lo hace en el grupo que sí recibieron este tipo de tratamiento (Figura 7 B).

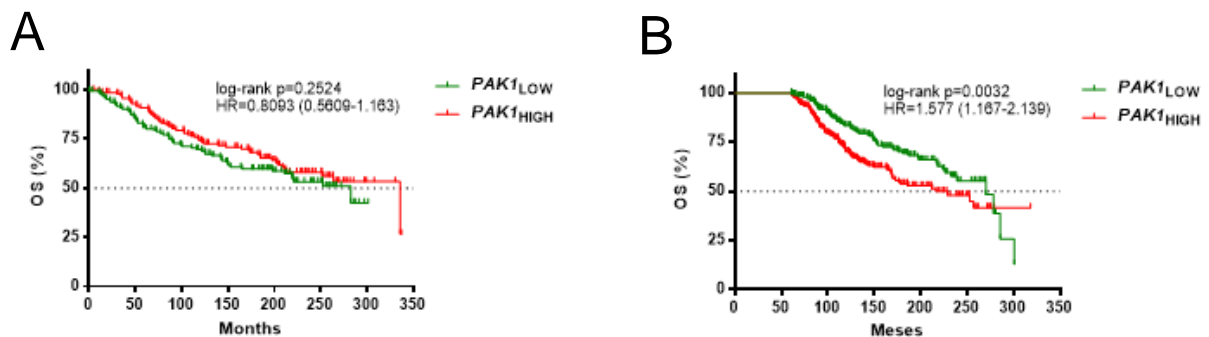


Figura 7: La alta expresión de *PAK1* correlaciona con un peor pronóstico en pacientes de cáncer de mama ER positivo tratados con terapia endócrina. Análisis de supervivencia de *Kaplan-Meier* mostrando el porcentaje de supervivencia global (OS) de pacientes de cáncer de mama estratificados de acuerdo a la baja (LOW, verde) o alta (HIGH, rojo) expresión de *PAK1* en METABRIC. **A)** Pacientes ER positivo no tratados con terapia endócrina (n=291); *PAK1*: log-rank p=0.2524; HR = 0.8093; IC 95%: 0.5609-1.163 (*PAK1_{LOW}* vs. *PAK1_{HIGH}*). **B)** Pacientes ER positivo tratados con terapia endócrina (n=521); *PAK1*: log-rank p=0.0032; HR = 1.577; IC 95%: 1.167-2.139 (*PAK1_{LOW}* vs. *PAK1_{HIGH}*).

Por último, decidimos evaluar la relevancia de estos marcadores como potenciales firmas genéticas de respuesta al tratamiento endócrino. Por esta razón, llevamos adelante una clasificación de las pacientes de acuerdo a la baja o alta expresión de estos genes combinados. Así, conformamos 3 grupos diferentes: *TIAM1-VAV3-PAK1*, *TIAM1-PAK1* y *VAV3-PAK1* y evaluamos las curvas de supervivencia. Como se puede observar en la Figura 8, la alta expresión de las 3 firmas genéticas correlaciona con un peor pronóstico en las pacientes tratadas con terapia endócrina, siendo la mediana de supervivencia global menor y aumentando considerablemente el *hazard ratio* de los grupos de alta expresión, que representa cuánto más probable es que ocurra un suceso a que no ocurra (en este caso la muerte).

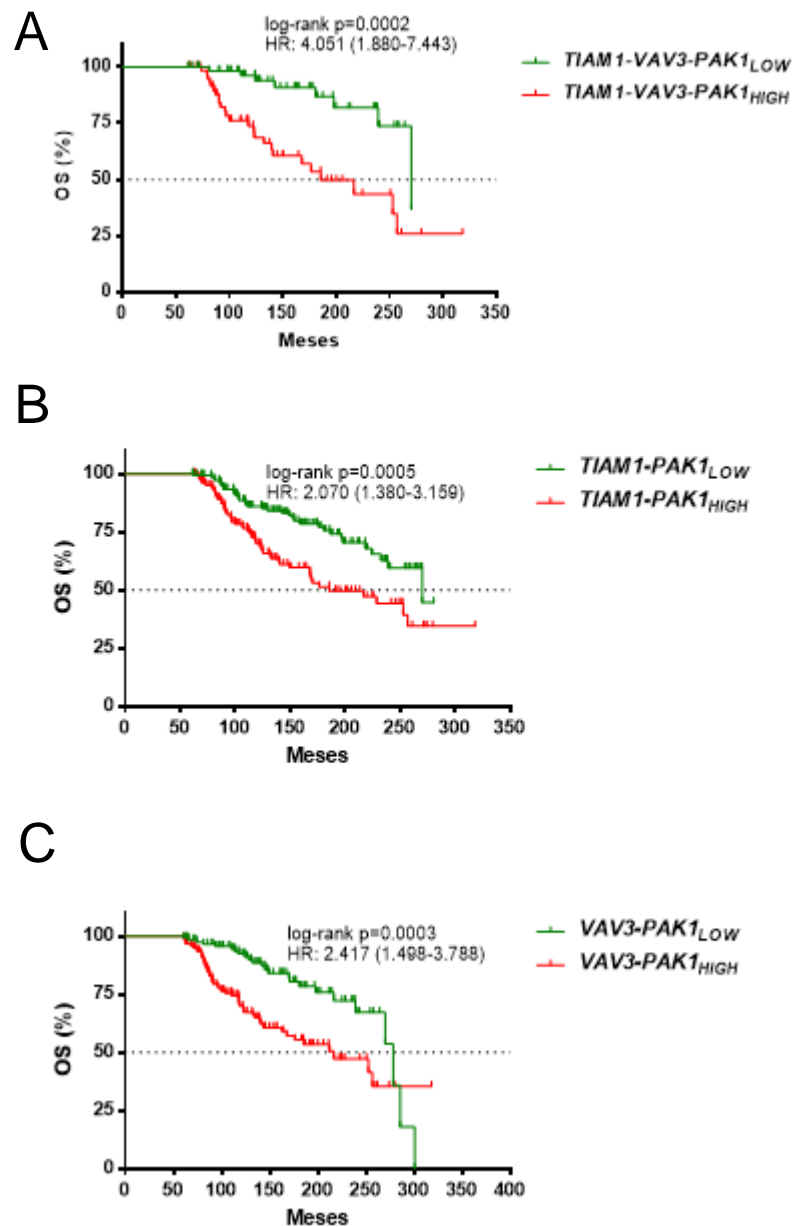


Figura 8: La alta expresión de diferentes firmas genéticas de integrantes de la vía de Rac1 correlaciona con un peor pronóstico en pacientes de cáncer de mama ER positivo tratados con terapia endócrina. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando el porcentaje de sobrevida global (OS) de pacientes de cáncer de mama tratados con terapia endócrina estratificados de acuerdo a la baja (LOW, verde) o alta (HIGH, rojo) expresión de las firmas genéticas **A) *TIAM1-VAV3-PAK1*, log-rank $p=0.0002$; HR = 4.051; IC 95%: 1.880-7.443 (*TIAM1-VAV3-PAK1*_{LOW} vs. *TIAM1-VAV3-PAK1*_{HIGH}) **B**) *TIAM1-PAK1*, log-rank $p=0.0005$; HR = 2.070; IC 95%: 1.380-3.159 (*TIAM1-PAK1*_{LOW} vs. *TIAM1-PAK1*_{HIGH}) y **C**) *VAV3-PAK1*, log-rank $p=0.0003$; HR = 2.417; IC 95%: 1.498-3.788 (*VAV3-PAK1*_{LOW} vs. *VAV3-PAK1*_{HIGH}) en METABRIC.**

A modo de resumen, la Tabla 4 muestra los resultados del estudio de curvas de sobrevida llevado a cabo para los genes de la vía de Rac1 seleccionados en las pacientes ER positivo tratadas con terapia endócrina.

Tabla 4: Resumen de los resultados del estudio de curvas de sobrevida llevado a cabo para los genes de la vía de Rac1 seleccionados.

Componente Vía de Señalización RAC1	Gen	ER positivo Terapia Endócrina	
		log-rank	Correlación Sobrevida Global
GAP	<i>RALBP1</i>	p=0.0966 HR=1.291 (0.9555-1.751)	NO
GEF	<i>TIAM1</i>	p=0.0375 HR=1.374 (1.022-1.876)	Alta expresión - Peor pronóstico
	<i>VAV3</i>	p=0.0420 HR=1.370 (1.012-1.853)	Alta expresión - Peor pronóstico
	<i>TRION</i>	p=0.3163 HR=1.167 (0.8629-1.580)	NO
EFECTOR	<i>PAK1</i>	p=0.0032 HR=1.577 (1.167-2.139)	Alta expresión - Peor pronóstico
FIRMAS GENETICAS	<i>TIAM1- VAV3- PAK1</i>	p=0.0002 HR=4.501 (1.880-7.443)	Alta expresión - Peor pronóstico
	<i>TIAM1- PAK1</i>	p=0.0005 HR=2.070 (1.380-3.159)	Alta expresión - Peor pronóstico
	<i>VAV3- PAK1</i>	p=0.0003 HR=2.417 (1.498-3.788)	Alta expresión - Peor pronóstico

Discusión Parcial – Capítulo II

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo (GLOBOCAN 2012). En Argentina mueren aproximadamente 60 mil personas por año, el 20% del total de defunciones que se producen anualmente en el país (145). Es un grupo de enfermedades que se caracterizan principalmente por presentar fallas en los mecanismos implicados en la proliferación y recambio celular. Cualquier alteración que provoque cambios en estos procesos, puede alterar la estructura celular organizada y desencadenar los procesos de desarrollo tumoral.

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo, siendo el más frecuente entre las mujeres (1). Es una patología muy compleja y heterogénea, que presenta características biológicas e histopatológicas distintivas. Numerosos genes involucrados en el control del crecimiento y diferenciación celular y apoptosis potencian la complejidad de la enfermedad y dificultan la elección de la opción terapéutica. El estado de menopausia de la paciente, el grado o estadio del tumor y la expresión de receptores específicos pueden influenciar la selección del tratamiento (2). En este sentido, el cáncer de mama puede ser clasificado biológicamente en tres grandes grupos o subtipos, de acuerdo a la expresión de ciertos biomarcadores o receptores específicos: tumores receptores hormonales positivos, que expresan ER y/o PR; tumores HER2 positivos, que sobreexpresan o tienen amplificado el gen HER2/neu; y tumores triple negativos, que no expresan ninguno de estos tres receptores (ER, PR o HER2/neu) (146).

Los biomarcadores pueden ser categorizados de acuerdo a la utilidad que se les va a dar en la clínica. Por ejemplo, podemos contar con biomarcadores de diagnóstico de la presencia de la enfermedad; predictivos de respuesta a algún tratamiento, o de pronóstico. Un ejemplo tradicional de biomarcador molecular para cáncer de mama que se utiliza en la clínica es la presencia de ER y/o PR (evaluada mediante técnicas histológicas y de unión al ligando), que predicen la sensibilidad al tratamiento endócrino. Otro ejemplo lo conforma la sobreexpresión/amplificación de HER2 (ERBB2), como predictor de respuesta al tratamiento con los anticuerpos monoclonales trastuzumab y pertuzumab (20). Los resultados clínicos muestran que aquellos pacientes que tienen sobreexpresado HER2 (aproximadamente un 20% del total de pacientes), mejoran la supervivencia global y progresión libre de enfermedad (20, 147)

En los últimos años comenzaron a comercializarse varios ensayos moleculares en los Estados Unidos y Europa, como Prosigna, MammaPrint y Oncotype DX. Estas pruebas analizan muestras del tumor, determinando la expresión de un conjunto de genes relacionados a diferentes aspectos de la biología tumoral. Prosigna (anteriormente llamada PAM50), ayuda a determinar el beneficio de usar quimioterapia junto con terapia endócrina

para algunos tumores ER positivos/HER2 negativos. Esta prueba determina un valor arbitrario, en base al análisis de 50 genes. Si el resultado muestra que la paciente tiene un riesgo alto de metástasis (el puntaje PAM50 es alto), se recomienda la elección de un tratamiento mucho más agresivo de quimioterapia y terapia endócrina. En cambio, si la prueba muestra un bajo riesgo de metástasis (el puntaje PAM50 es bajo), se puede utilizar terapia endócrina solamente (148-151).

Mammaprint y Oncotype DX miden la expresión de 70 y 21 genes, respectivamente. El primero permite predecir recurrencia luego de recibido el tratamiento quimioterápico (152). El segundo, predice la recurrencia de pacientes con tumores invasivos ER positivos/HER2 negativos. Igualmente, a pesar de las numerosas opciones que aparecen en bibliografía como potenciales biomarcadores, un grupo muy reducido de genes ha sido aprobado y validado por la FDA (153).

El tratamiento del cáncer de mama involucra diversas combinaciones de cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia endócrina. El estudio exhaustivo de la biología tumoral de los pacientes, explorando vías de señalización que se encuentran alteradas, ha contribuido significativamente en el entendimiento de la enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico y la elección del tratamiento todavía se basan, en gran medida, en técnicas histopatológicas e inmunohistoquímicas clásicas. Por esta razón, sabiendo que se necesita un enfoque más cuantitativo para el diagnóstico y la individualización racional del tratamiento, en la actualidad se están realizando grandes esfuerzos en mejorar la precisión de las pruebas de biomarcadores predictivos. En este sentido, el desarrollo tecnológico de secuenciación genómica, ha propiciado la obtención y generación de cantidades masivas de datos biomédicos, que vienen a colaborar con este objetivo.

El uso de microarrays y de tecnologías de secuenciación masiva o RNA-seq permite determinar los niveles de expresión del transcriptoma. Al medir la expresión de muestras de pacientes y compararla con controles sanos, se pueden identificar genes que muestren expresión diferencial entre ambos grupos. A su vez, dentro de un mismo grupo, pueden categorizarse a los pacientes de acuerdo a niveles arbitrarios de expresión de un determinado grupo de genes. Este enfoque se ha utilizado para identificar genes implicados en numerosas enfermedades, así como para crear firmas genéticas pronósticas capaces de clasificar a los pacientes en grupos de alto o bajo riesgo.

El *big data* en biomedicina tiene ejemplos típicos de recursos y herramientas que se están utilizando actualmente en investigación traslacional. Una de las primeras bases de datos disponible fue OncoPrint, que proporciona acceso a una gran colección de datos de expresión génica para diferentes tipos de cáncer. Quizás la base de datos más grande que

existe en la actualidad es la proporcionada por el proyecto “The Cancer Genome Atlas” (TCGA), del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) y el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos. Este proyecto, de acceso totalmente público, posee información sobre los principales cambios genómicos de 33 tipos de cáncer (154).

Por otro lado, recursos informáticos como cBioportal (www.cbioportal.org) han permitido un acceso menos restringido a datos genómicos complejos, a través de herramientas de código abierto, favoreciendo significativamente la obtención de datos biomédicos como alteraciones en el número de copias de un gen, niveles de expresión de ARNm y de micro ARN o mutaciones puntuales, correlacionados con la historia clínica de cada paciente. En línea con cBioportal, la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO) es un repositorio público internacional, respaldado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) que archiva y distribuye libremente la expresión génica de múltiples estudios de microarrays, *RNA-seq* y otras formas de obtención a gran escala de datos genómicos.

En este trabajo nos propusimos explorar diferentes bases de datos de pacientes de cáncer de mama, analizando los valores de expresión de integrantes de la vía de señalización de Rac1, con el objetivo de determinar potenciales roles de éstos como predictores de respuesta al tratamiento endócrino en cáncer de mama.

En primer lugar, llevamos a cabo la elección de aquellos integrantes de la vía de Rac1 involucrados en los procesos de desarrollo tumoral, metástasis o resistencia en cáncer de mama. Establecimos grupos de genes clasificados de acuerdo a su función dentro de la vía. Así, evaluamos la expresión de diferentes activadores de tipo GEF (*TIAM1*, *VAV3*, *TRION* y *ARHGEF2*), proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) (*RALBP1*, *CHN2*, *ARHGAP9*, *ARHGAP22* y *SRGAP2*); *RAC1* (como nodo central de la vía) y *PAK1* (como efector directo).

Un primer análisis de expresión nos permitió conocer el *status* de estos genes en pacientes con cáncer de mama, en comparación con muestras de tejidos de controles sanos. Clasificando a las pacientes de acuerdo a la expresión o no de ER, pudimos identificar genes que mostraban expresión diferencial con respecto al tejido normal. En este sentido, las pacientes ER positivo mostraron una sobreexpresión de los GEFs *TIAM1*, *VAV3*, *TRION* y una disminución en la expresión de *RALBP1*. Por otro lado, las pacientes ER negativo, también mostraron sobreexpresión de *TIAM1* y *TRION*, pero una expresión disminuida de *VAV3*, *RALBP1* y de *RAC1*.

Estos resultados nos permitieron seleccionar a aquellos genes con expresión

diferencial entre tejido normal y tumoral, de manera de poder evaluar sus posibles roles como biomarcadores de respuesta. Así, evaluamos curvas de sobrevida, teniendo en cuenta los niveles de expresión de *TIAM1*, *VAV3*, *RALBP1* y *PAK1*. En este sentido, de existir alguna relación de la vía de Rac1 con un peor pronóstico, se esperaría que aquellas alteraciones que provoquen la activación de la vía, muestren correlación con una disminución de la sobrevida global. Esto sería posible en los casos de alta expresión de los GEFs, baja expresión de los GAPs o alta expresión de los efectores.

Utilizamos la base de datos METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*), clasificando a los pacientes en grupos de baja (LOW) o alta (HIGH) expresión del gen, de acuerdo a un valor de corte para cada uno. La METABRIC es un proyecto entre Canadá y el Reino Unido, que clasifica los tumores mamarios en diferentes subcategorías basadas en firmas genéticas. La elección de este proyecto se debió a que es el mayor estudio genético a nivel mundial sobre cáncer de mama, que cuenta con un número estadísticamente relevante de muestras de pacientes ER positivos y negativos, con un seguimiento clínico a largo plazo. Al analizar curvas de sobrevida de pacientes triples negativos y ER positivos (sin discriminar por tratamiento), observamos que los niveles alterados de expresión de los genes seleccionados no correlacionaban con cambios en la sobrevida global.

Nuestra hipótesis plantea a la vía de señalización de Rac1 como un componente importante en el desarrollo de resistencia adquirida a las terapias endócrinas. La resistencia adquirida, en contraste con la resistencia intrínseca, implica una respuesta inicial al tratamiento, seguida por una posterior progresión de la enfermedad. Por esta razón, decidimos evaluar qué ocurría con las curvas de sobrevida de las pacientes ER positivo, discriminándolas en dos grupos: aquellas que habían sido tratadas con algún tipo de terapia endócrina, y aquellas que no. De esta manera observamos que la alta expresión de *TIAM1*, *VAV3* y *PAK1*, muestran una correlación estadísticamente significativa con un peor pronóstico. En resumen, aquellas pacientes que presentaban altos valores de expresión de estos genes, tuvieron una menor sobrevida global.

En el año 2016, la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO, por sus siglas en inglés) emitió un informe conteniendo las recomendaciones de tratamiento para pacientes con cáncer de mama ER positivo (155). En esta investigación refuerzan la elección de la terapia endócrina como tratamiento de primera línea para este grupo de pacientes, con excepción de los casos en los que exista riesgo inmediato de muerte. Además, recomiendan que los pacientes alternen entre diferentes tipos de terapia endócrina y/o quimioterapia, de acuerdo a la progresión del tumor, los efectos adversos de la terapia y los síntomas asociados

a la enfermedad. Al analizar las curvas de supervivencia de pacientes ER positivo tratados con terapia endócrina y categorizados de acuerdo a la baja o alta expresión de los genes seleccionados, observamos que el estado de supervivencia de los pacientes de ambos grupos comienza a diferenciarse al transcurrir un cierto tiempo de tratamiento. Lo interesante de este hallazgo es que este comportamiento comienza a ser evidente al transcurrir aproximadamente 50-60 meses de tratamiento, tiempo totalmente acorde al desarrollo de mecanismos de resistencia adquirida. En este sentido, nuestra hipótesis plantea que las pacientes ER positivo se benefician inicialmente con el tratamiento endócrino, pero al transcurrir un tiempo, los niveles de expresión elevados de *TIAM1*, *VAV3* o *PAK1*, aceleran la progresión de la enfermedad. En línea con esta hipótesis, al estratificar los pacientes que presentaban la combinación de alta expresión de los 3 genes (*TIAM1-VAV3-PAK1*_{HIGH}, o ambas combinaciones de *GEF-PAK1* (*TIAM1-PAK1*_{HIGH} o *VAV3-PAK1*_{HIGH}) y compararlos con aquellos pacientes que presentaban bajos niveles de expresión de estas firmas genéticas, la disminución de la supervivencia global se hizo más evidente. Otra vez, las curvas de supervivencia mostraron mayores diferencias luego de transcurrido un periodo aproximado de 60 meses.

Por lo tanto, y a modo de resumen de este capítulo, el análisis de expresión de diferentes integrantes de la vía de Rac1 nos permitió conocer qué genes presentaban niveles de expresión diferencial con respecto a muestras de tejido mamario normal. A su vez, demostramos que la alta expresión de *TIAM1*, *VAV3* y *PAK1* correlacionan con una disminución en la supervivencia global de pacientes ER positivos tratados con terapia endócrina. Por último, debido a que este resultado no se encontró para otro tipo de pacientes (ya sean ER positivos no tratados con terapia endócrina o triples negativos), los datos sugerirían la posibilidad de que *TIAM1-VAV3-PAK1* podrían constituirse como marcadores de respuesta al tratamiento con terapias endócrinas. Se están realizando estudios en este sentido.

Conclusiones Parciales – Capítulo II

- Se analizaron los niveles de expresión de diferentes genes miembros de la vía de señalización de Rac1 en muestras de tejido normal, pacientes ER positivo y pacientes ER negativo, del *set* de datos GSE42568, de GEO NCBI.
- La clasificación de los miembros de la vía de Rac1 se llevó adelante de acuerdo al rol que cumplían en el ciclo de activación de esta proteína. De esta manera, se analizaron los siguientes grupos:
 - GEFs: *TIAM1*, *VAV3*, *TRION*, *ARHGEF2*
 - *RAC1* (nodo central)
 - GAPs: *RALBP1*, *CHN2*, *ARHGAP9*, *ARHGAP22*, *SRGAP2*
 - *PAK1* (efector directo)
- El análisis comparativo de expresión de las muestras de cáncer de mama ER positivo y ER negativo con respecto a tejido normal demostró que:
 - La expresión de *TIAM1*, *VAV3*, *TRION* y *PAK1* se encuentra sobreexpresada y la de *RALBP1* disminuida, en cáncer de mama ER positivo.
 - La expresión de *VAV3* y *RALBP1* se encuentra disminuida en cáncer de mama ER negativo.
 - La expresión de *RAC1* se encuentra disminuida en cáncer de mama ER negativo.
- El análisis de curvas de supervivencia de muestras de pacientes del METABRIC demostró que:
 - Ninguno de los genes analizados en este *set* de datos posee valor predictivo de pronóstico en pacientes de cáncer de mama triple negativos.
 - la alta expresión de *TIAM1*, *VAV3* y *PAK1* correlacionan positivamente con un peor pronóstico en pacientes de cáncer de mama ER positivo tratado con terapia endócrina.
 - La alta expresión de las firmas genéticas *TIAM1-VAV3-PAK1*, *TIAM1 -PAK1* y *VAV3-PAK1* aumentan el peor pronóstico de pacientes de cáncer de mama ER positivo tratado con terapia endócrina.

**CAPITULO III - El rol de GTPasa Rac1
como componente importante en el
desarrollo de resistencia endócrina**

Las pacientes ER positivo representan un 70% de todos los tipos de cáncer de mama y la terapia endócrina es el principal tratamiento para estas pacientes. Los dos grandes tipos de terapias endócrinas lo comprenden los IAs, como anastrozol y letrozol; y los SERMs, como Tam. Anastrozol y letrozol actúan disminuyendo los niveles de estrógeno circulante inhibiendo la enzima aromatasa encargada de sintetizarlo; en cambio Tam lo hace inhibiendo la actividad del ER.

A pesar del éxito de los tratamientos hormonales disponibles para cáncer de mama y del perfil toxicológico favorable que presentan, un porcentaje importante de los pacientes desarrollan mecanismos de resistencia a estas terapias, que complican el panorama clínico y provocan la recurrencia de la enfermedad. Actualmente existen evidencias muy contundentes que sitúan a la vía de señalización de Rac1 como pieza clave en el fenómeno de resistencia adquirida a los tratamientos hormonales.

PAK1, efector director de Rac1, es capaz de fosforilar al ER en el residuo Ser305, aumentando la expresión de CycD1 (60) y la actividad transcripcional del ER. Otros trabajos mostraron que la activación aberrante de EGFR o del activador de Rac1 Vav3 son capaces de contribuir al desarrollo de hormono-independencia en células de carcinoma mamario humano.

Por otro lado, en pacientes de cáncer de mama pre-menopáusicas, altos niveles de expresión de PAK1 y su presencia nuclear correlacionan con una baja respuesta a Tam. Además, estudios de asociación de genoma completo (GWAS) demostraron que la vía de señalización Vav3/Rac1/PAK1 es capaz de desarrollar mecanismos de resistencia a terapias endócrinas (103).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los antecedentes que muestran la importancia de Rac1 en el fenotipo resistente, el objetivo central del presente capítulo fue profundizar los conocimientos sobre los mecanismos de resistencia endócrina vinculados con la sobreactivación de la vía de señalización de Rac1 y la evaluación de 1A-116 como posible agente terapéutico para la reversión de dichos mecanismos en células de cáncer mamario.

**CAPITULO III A - Implicancias de Rac1
en el desarrollo de resistencia a
Inhibidores de Aromatasa**

ERK1/2 se encuentra sobreactivada en un modelo celular de resistencia a IAs

Evaluamos el efecto anti-proliferativo de diferentes IAs sobre la línea celular de cáncer de mama hormono-dependiente MCF7 y el modelo de cáncer de mama humano con resistencia adquirida a IAs (MCF7-LTED). Las células se trataron durante 72h con anastrozol o letrozol 10 μ M y se determinó la proliferación celular mediante el método colorimétrico de cristal violeta. Como se muestra en la Figura 1 A, los IAs testeados inhibieron la proliferación celular de MCF7 (aunque anastrozol tuvo un efecto mucho más modesto que letrozol). Sin embargo, los IAs evaluados no provocaron cambios en la capacidad proliferativa de las células MCF7-LTED. Al analizar diferentes proteínas de señalización de estas líneas celulares, encontramos que el modelo MCF7-LTED presenta una sobreexpresión de ER (Figura 1 B) y un aumento en la activación de ERK1/2 (Figura 1 C) en comparación con MCF7.

1A-116 devuelve la sensibilidad a IAs en células resistentes MCF7-LTED

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, evaluamos el status de activación de Rac1 en el modelo celular resistente a IAs. Para ello, llevamos adelante un ensayo de pull-down de células MCF7 y MCF7-LTED creciendo en condiciones normales y evaluamos los niveles de Rac1-GTP mediante western blot. Como se observa en la Figura 2 A, las células MCF7-LTED presentan mayores niveles de activación de Rac1 en comparación con las células MCF7.

Al evaluar el efecto anti-proliferativo de 1A-116 en estos modelos, observamos que MCF7-LTED resultó ser más sensible a este tratamiento (Figura 2 B), al mostrar una IC50 de 12 μ M, 2 veces menor que las células wild type (Figura 2 C)

Con el objetivo de evaluar el impacto de la inhibición de Rac1 en el modelo MCF7-LTED, llevamos adelante un ensayo de combinación de IAs con 1A-116 y analizamos la proliferación celular y los niveles de activación de ERK1/2 en respuesta a los tratamientos.

En primer lugar, evaluamos el efecto anti-proliferativo de los tratamientos combinados mediante un ensayo de proliferación celular. Como se muestra en la Figura 2 D, la combinación con 1A-116 logró revertir la resistencia a IAs, mostrando un efecto más notorio en la combinación anastrozol + 1A-116.

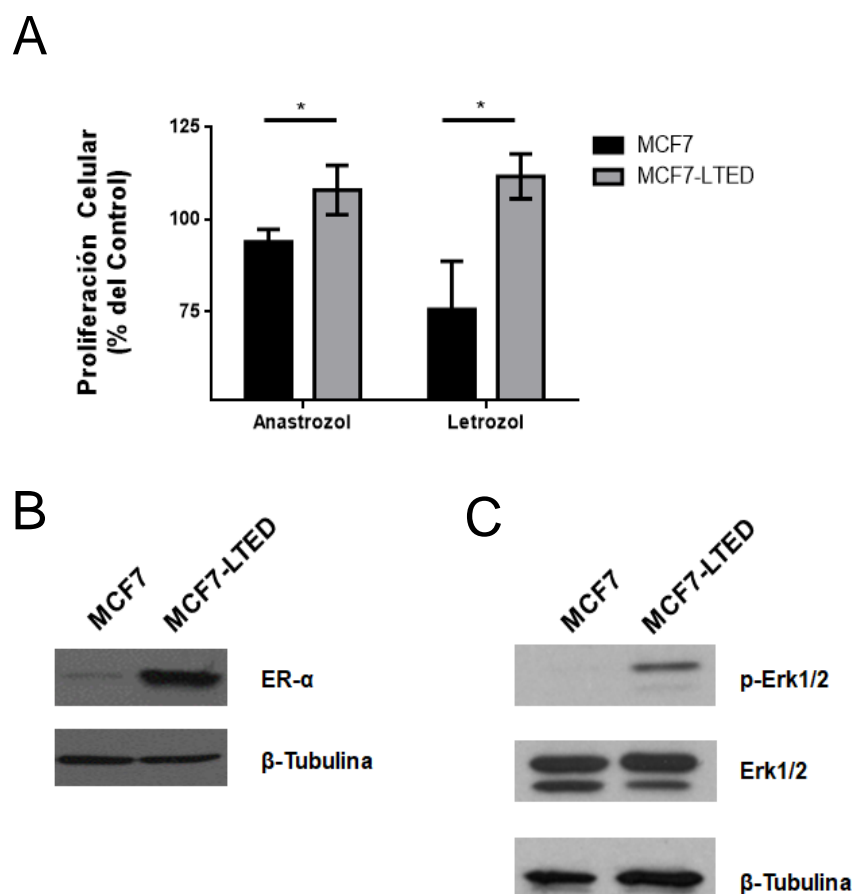


Figura 1: El modelo MCF7-LTED resistente a IAs presenta una sobreactivación de ERK1/2. A) Células MCF7 y MCF7-LTED fueron sembradas en placas de 96 *wells* y a las 24 h fueron tratadas con anastrozol o letrozol 10 μ M. Luego de 72 h se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de cristal violeta. A) MCF7-LTED no sufrió cambios en la capacidad proliferativa. Barras, S.E.M. t test, * $p < 0.05$. Los resultados están expresados como porcentaje del control y son representativos de al menos tres experimentos independientes. Lisados celulares de MCF7 y MCF7-LTED creciendo en condiciones normales fueron separados mediante SDS-PAGE y los niveles de ER, p-ERK1/2 y ERK1/2 fueron detectados mediante western blot. B) Las células MCF7-LTED mostraron una sobreexpresión de ER, en comparación con las células MCF7 control. C) Las células MCF7-LTED mostraron mayores niveles de fosforilación (activación) de ERK1/2, en comparación con las células MCF7 control. En ambos casos se detectaron los niveles de β -Tubulina como control de carga.

Por otro lado, tratamos células MCF7-LTED con anastrozol o letrozol 10 μ M, 1A-116 4 μ M o la combinación durante 24 h, generamos lisados celulares totales y analizamos los niveles de p-ERK1/2 mediante western blot. Como puede observarse en la Figura 3, el tratamiento con anastrozol (Figura 3 A) o letrozol (Figura 3 B) provocó un aumento en los niveles de p-ERK1/2. Sin embargo, el tratamiento con 1A-116 solo o en combinación con estos IAs logró disminuir esta activación. En ambos esquemas de tratamientos, los niveles totales de ERK1/2 no sufrieron alteraciones y la concentración de 1A-116 utilizada no provocó cambios en la proliferación celular (datos no mostrados).

En resumen, la inhibición de Rac1 en las células resistentes MCF7-LTED disminuye los niveles de activación de ERK1/2 repercutiendo en una reversión de la resistencia a IAs.

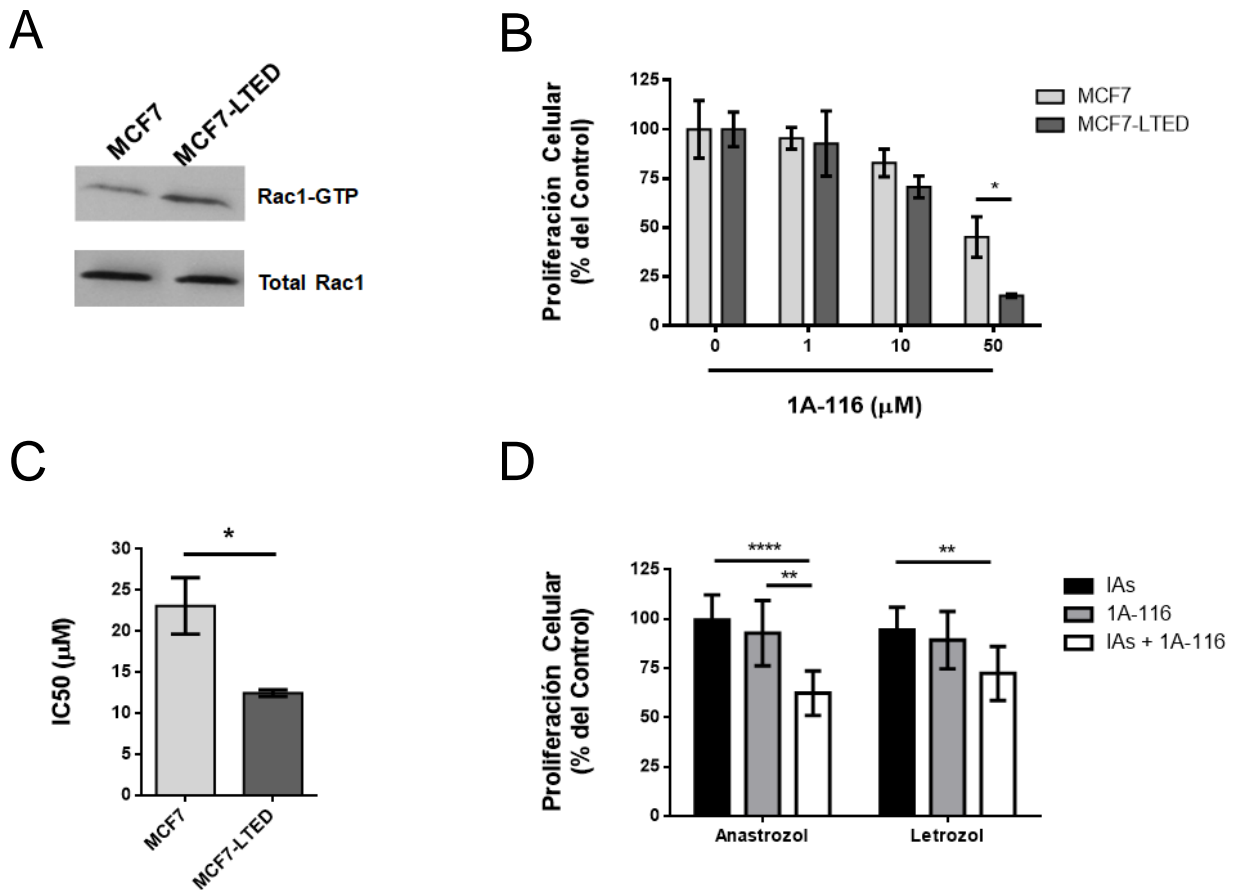


Figura 2: La inhibición de Rac1 mediante 1A-116 es capaz de revertir la resistencia a IAs. A) Ensayo de *pull-down* para detectar niveles de activación de Rac1. Las células MCF7-LTED presentan sobreactivada la proteína Rac1, en comparación con las células MCF7 control. Células MCF7 y MCF7-LTED fueron sembradas en placa de 96 wells y a las 24 hs fueron tratadas con diferentes concentraciones de 1A-116. Luego de 72 h se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de cristal violeta y la concentración que produjo el 50% de inhibición (IC50) fue determinada mediante regresión no lineal utilizando el *software* GraphPad Prism6®. B) MCF7-LTED presentó una mayor inhibición concentración-dependiente, en comparación con la línea control MCF7. Barras, S.E.M. ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, * $p < 0.05$. C) MCF7-LTED mostró una IC50 de 12 μM vs. 23 μM de las células MCF7 control. Barras, S.E.M. t test, * $p < 0.05$. D) MCF7-LTED fueron tratadas durante 72 h con anastrozol o letrozol 10 μM (barras negras), 1A-116 4 μM (barras grises) o combinación de IAs y 1A-116 (barras blancas). Barras, IC 95%. ANOVA doble vía, Tukey's Multiple Comparison Test, Comparación de IC 95%; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$. Los resultados están expresados como porcentaje del control y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

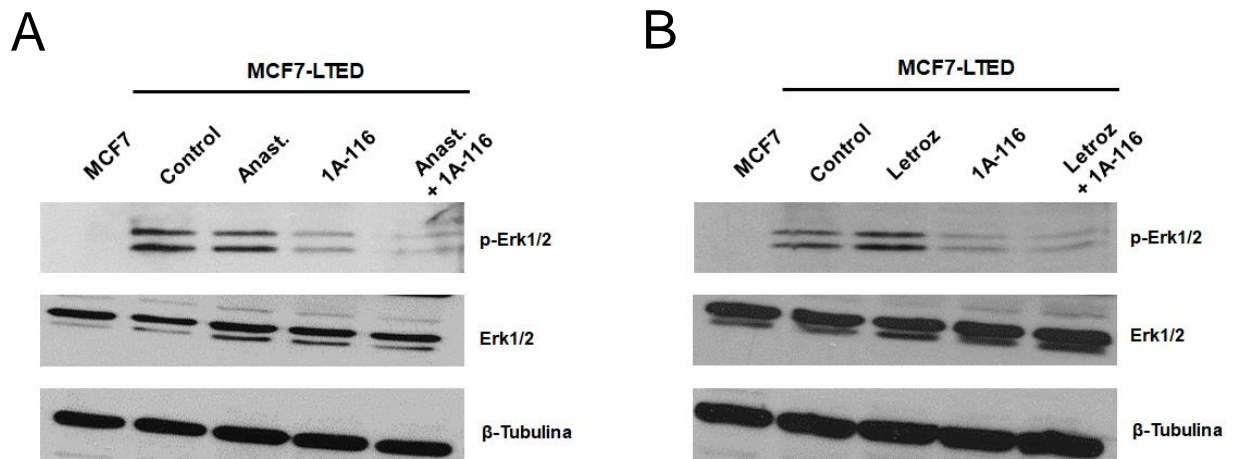


Figura 3: El tratamiento con 1A-116 disminuye los niveles de fosforilación de ERK1/2 en células resistentes a IAs. Células MCF7-LTED fueron tratadas durante 24 h con A) vehículo (control), anastrozol 10 μ M, 1A-116 4 μ M o combinación de ambos y B) vehículo (control), letrozol 10 μ M, 1A-116 4 μ M o combinación de ambos y los lisados celulares separados mediante SDS-PAGE. Se detectaron los niveles de p-ERK1/2, ERK1/2 y β -Tubulina (como control de carga). Lisados celulares de MCF7 se utilizaron como control negativo de la fosforilación de ERK1/2.

Conclusiones Parciales - Capítulo III A

- Las células MCF7-LTED resistentes a IAs presentan una sobreexpresión del ER y un aumento en los niveles de activación de ERK1/2 y de Rac1.
- Las células MCF7-LTED presentan una mayor sensibilidad a la inhibición de Rac1 mediante 1A-116.
- La combinación de 1A-116 con anastrozol o letrozol disminuye los niveles de activación de ERK1/2 y revierte la resistencia a estos IAs.

CAPITULO III B - Implicancias de Rac1
en el desarrollo de resistencia a
Tamoxifeno

Desarrollo de un modelo celular de cáncer de mama humano con sobreactivación de Rac1

Se generaron dos modelos celulares de cáncer de mama con el objetivo de estudiar la relación entre la activación de Rac1 y los mecanismos de resistencia a Tam. Para ello, transfectamos de manera estable la línea celular MCF7 con la construcción C1199 Tiam1 (versión truncada en su N-terminal y constitutivamente activa del activador de tipo GEF Tiam1) o el vector vacío (pcDNA.3). Luego de un período de selección con G418, establecimos el modelo MCF7::C1199 que sobreexpresa la versión truncada descrita de Tiam1 (Figura 4 A) y que presenta mayores niveles de Rac1 activo (Figura 4 B).

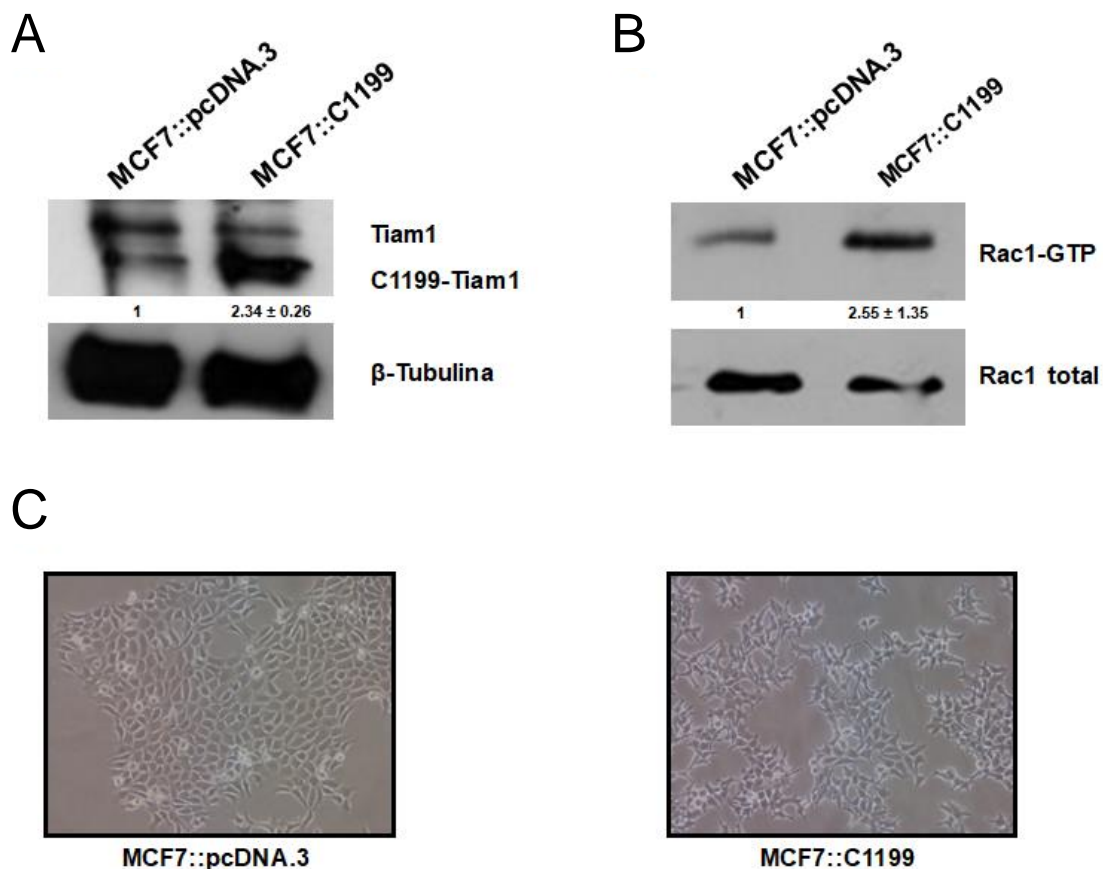


Figura 4: Rac1 se encuentra sobreactivado en el modelo celular MCF7::C1199. Células MCF7 de cáncer de mama humano fueron transfectadas con una versión CA del activador de tipo GEF de Rac1 Tiam1 (MCF7::C1199) o vector vacío (MCF7::pCDNA.3). Lisados celulares de ambos modelos fueron separados por SDS-PAGE. A) Detección de niveles de C1199-Tiam1 por western blot. B) Ensayo de pull-down para detectar niveles de activación de Rac1. MCF7::C119 presenta mayores niveles de Rac1-GTP (activo) en comparación con MCF7:pCDNA.3 Se muestran las medias de densitometría \pm S.E.M (unidades arbitrarias, tomando los niveles de MCF7::pCDNA.3 como 1). C) Microfotografías representativas de los modelos generados creciendo en condiciones normales (microscopía de campo claro 200X).

Como describieron Adam et al. (156), la sobreactivación de esta GTPasa provocó cambios fenotípicos en las células MCF7::C1199 asociados a procesos regulados por Rac1, como la formación de lamelipodios (Figura 4 C) y un aumento de la capacidad migratoria, tanto en presencia de CSS como de SFB (Figura 5 A-B). Además, la tasa de proliferación celular de MCF7::C1199 aumentó, mostrando un menor tiempo de duplicación en comparación con las células MCF7::pCDNA.3 (Figura 5 C).

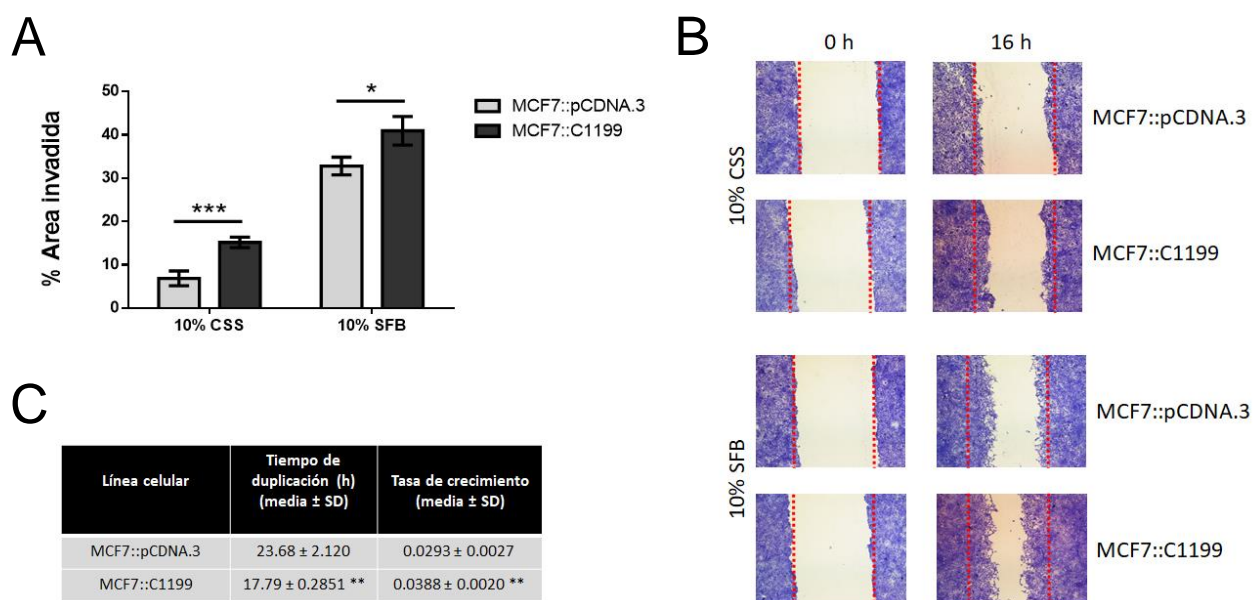


Figura 5: La sobreactivación de Rac1 aumenta la migración y proliferación celular. A) Se realizó un ensayo de migración en herida sobre monocapas confluentes de células MCF7::pCDNA.3 y MCF7::C1199, creciendo en presencia de 10% CSS o 10% SFB. Después de 16 hs de incubación, las células fueron fijadas y teñidas con azul de metileno. El porcentaje de área invadida (expresado como media, n=10) fue analizado mediante el software NISElement 3.0. Barras, S.D., Unpaired t test, *p<0.05; ***p<0.001. B) Microfotografías representativas (200X) del ensayo de migración en herida. Las líneas punteadas rojas representan la herida control a tiempo 0 (cero). C) Células MCF7::pCDNA y MCF7::C1199 fueron sembradas en placa de 12 wells, se realizó recuento celular por hemocitómetro y tinción con azul tripán cada 24 h y posteriormente se determinó el tiempo de duplicación mediante el software GraphPad Prism6®. La tasa de crecimiento se define como número de duplicaciones por unidad de tiempo (h). Unpaired t test, **p<0.01 vs. MCF7::pCDNA.3.

La sobreactivación de Rac1 provoca un fenotipo hormono-independiente en células de cáncer de mama humano

Buscando explorar la relación entre la sobreactivación de Rac1 y la respuesta a estrógenos, evaluamos en primer lugar los niveles de expresión proteicos de ER en los modelos celulares MCF7::pCDNA.3 y MCF7::C1199 mediante western blot (Figura 6 A) y citometría de flujo (Figura 6 B). Los niveles de ER no sufrieron alteración en su expresión en estos modelos.

Para evaluar la respuesta a E₂, tratamos ambos modelos celulares durante 72 h con diferentes concentraciones de E₂ y analizamos la proliferación celular en respuesta a este

estímulo. Como se muestra en la Figura 6 C, estos tratamientos aumentaron la proliferación celular en MCF7::pcDNA.3, de manera concentración-dependiente. Sin embargo, las células MCF7::C1199 no respondieron a dicho estímulo, mostrando que la sobreactivación de Rac1 provoca un fenotipo hormono-independiente en células de cáncer de mama humano.

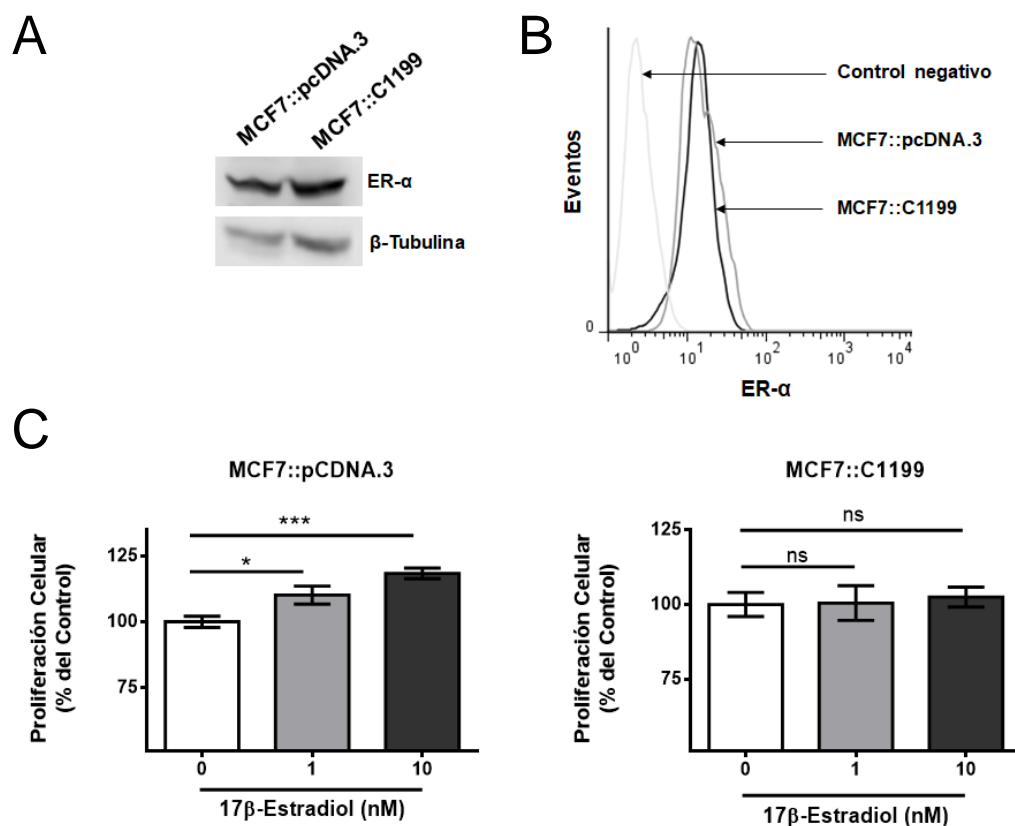


Figura 6: La sobreactivación de Rac1 provoca un fenotipo hormono-independiente. Lisados celulares de MCF7::pcDNA.3 y MCF7::C1199 fueron separados por SDS-PAGE y se detectaron los niveles de expresión de ER en ambos modelos mediante A) western blot y B) citometría de flujo. C) Células MCF7::pcDNA.3 y MCF7::C1199 creciendo en placas de 96 wells fueron tratadas durante 72 h con diferentes concentraciones de 17-β-Estradiol (E2). Se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de cristal violeta. Barras, S.E.M. ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test; ns, diferencias no significativas; *p<0.05; ***p<0.001 vs. control. Los resultados están expresados como porcentaje del control y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

La inhibición de Rac1 restablece la sensibilidad a Tam en células resistentes

Para evaluar el efecto anti-proliferativo de Tam en los modelos generados, las células fueron tratadas durante 72 h con diferentes concentraciones de Tam y la proliferación celular analizada mediante el método colorimétrico de cristal violeta. Como se esperaba, el tratamiento con Tam de células MCF7::pcDNA.3 inhibió la proliferación celular de manera concentración-dependiente. Sin embargo, las células MCF7::C1199 no sufrieron ningún

cambio en su capacidad proliferativa en estas condiciones (Figura 7 A). Por esta razón, y buscando evaluar las implicancias de Rac1 en el desarrollo de un fenotipo resistente a Tam, primero evaluamos el efecto de 1A-116 en los modelos MCF7. Las células MCF7:pCDNA.3 resultaron ser menos sensibles a 1A-116 que las células MCF7::C1199. En este sentido, MCF7::C1199 mostró una IC50 de 9 μ M, un valor 7 veces menor que la IC50 de las células MCF7::pCDNA.3 (Figura 7 B). Finalmente, evaluamos el efecto de la combinación de una concentración sub-IC50 de 1A-116 con diferentes concentraciones de Tam y observamos que el tratamiento combinado de 1A-116 con Tam en células MCF7::C1199 restableció el efecto anti-proliferativo de Tam (Figura 7 C), mostrando que la inhibición de Rac1 es capaz de revertir la resistencia a Tam.

La inhibición de la vía de señalización Rac1-PAK1 revierte los mecanismos de resistencia de Tam en células de cáncer de mama resistentes

Debido a que uno de los mecanismos que pueden explicar el desarrollo de resistencia adquirida a Tam se debe a que PAK1 es capaz de fosforilar el residuo Ser305 de ER e inhibir los efectos de Tam, evaluamos el efecto de 1A-116 sobre los niveles de fosforilación de PAK1 en las células resistentes MCF7::C1199. Como se observa en la Figura 8 A, el tratamiento a diferentes tiempos con 1A-116 disminuyó los niveles de fosforilación de PAK1 (p-PAK1).. Luego, al evaluar el efecto de Tam sobre la fosforilación de PAK1 en estas células, observamos que dicho tratamiento incrementó los niveles de p-PAK1 y que 1A-116 revirtió esta fosforilación de PAK1 inducida por Tam (Figura 8 B). Además, la translocación nuclear de PAK1 también se comporta como un marcador de baja respuesta al tratamiento con Tam. En este sentido, las células MCF7::C1199 mostraron presencia de p-PAK1 en la fracción nuclear, mecanismo que fue inhibido por efecto de 1A-116 (Figura 8 C).

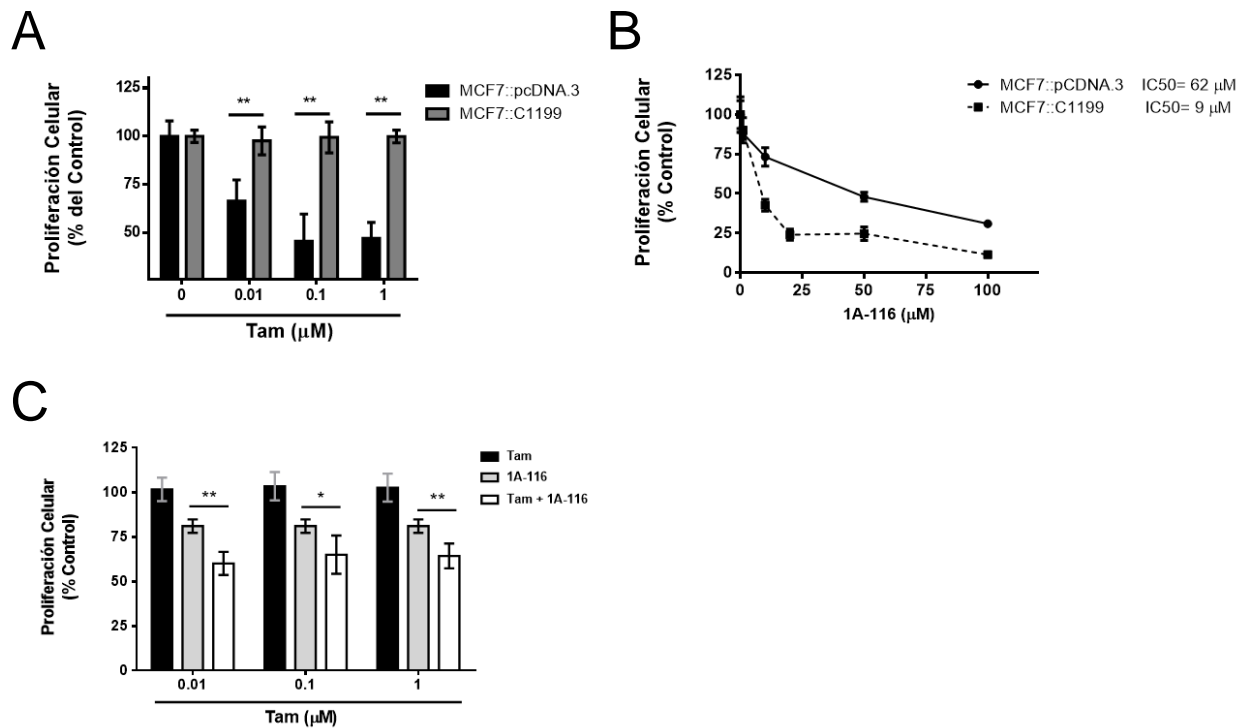


Figura 7: 1A-116 restablece la sensibilidad a Tam en células resistentes MCF7::C1199. Se trataron durante 72 h células MCF7::pcDNA.3 y MCF7::C1199 con diferentes concentraciones de A) Tam y B) 1A-116. La IC50 fue determinada mediante regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism6®. Barras de error, IC 95%. ANOVA doble vía, Tukey's Multiple Comparison Test, Comparación de IC 95%, ** $p < 0.01$ MCF7::pcDNA.3 vs. MCF7::C1199 a cada concentración de 1A-116. C) Se trataron durante 72 h células resistentes MCF7::C1199 con diferentes concentraciones de Tam (barras negras), 1A-116 4 μM (barras grises) o combinación de ambos (barras blancas). La concentración de Tam solo o en combinación con 1A-116 se muestran debajo de cada barra. Barras de error, IC 95%, ANOVA doble vía, Tukey's Multiple Comparison Test, Comparación de IC 95%, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 1A-116 vs. 1A-116 + Tam a cada concentración de Tam. Los resultados están expresados como porcentaje del control y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Para confirmar el mecanismo de traslocación nuclear de PAK1 mediado por una sobreactivación de Rac1, células COS-1 fueron co-transfectadas con la versión activa de Rac1 Q61L (o vector vacío EV) y PAK1 wild type (fusionada a EGFP). Al cabo de 24 h, subcultivamos y sembramos las células en vidrios cubiertos de poli-lisina y las tratamos o no durante 24 h con 1A-116. Luego, se fijaron y tiñeron con Alexa Fluor 555 conjugado a faloidina y DAPI y se analizaron mediante microscopía confocal. Como se observa en la Figura 9 (filas EV), las células transfectadas con el EV muestran presencia citosólica de PAK1, independientemente del tratamiento o no con 1A-116. Por otro lado, en aquellas células transfectadas con la versión activa de Rac1 (Q61L) (filas Rac1 Q61L) y tratadas con vehículo, se observa presencia nuclear de PAK1. Sin embargo, este mecanismo de traslocación nuclear fue revertido por el tratamiento con 1A-116.

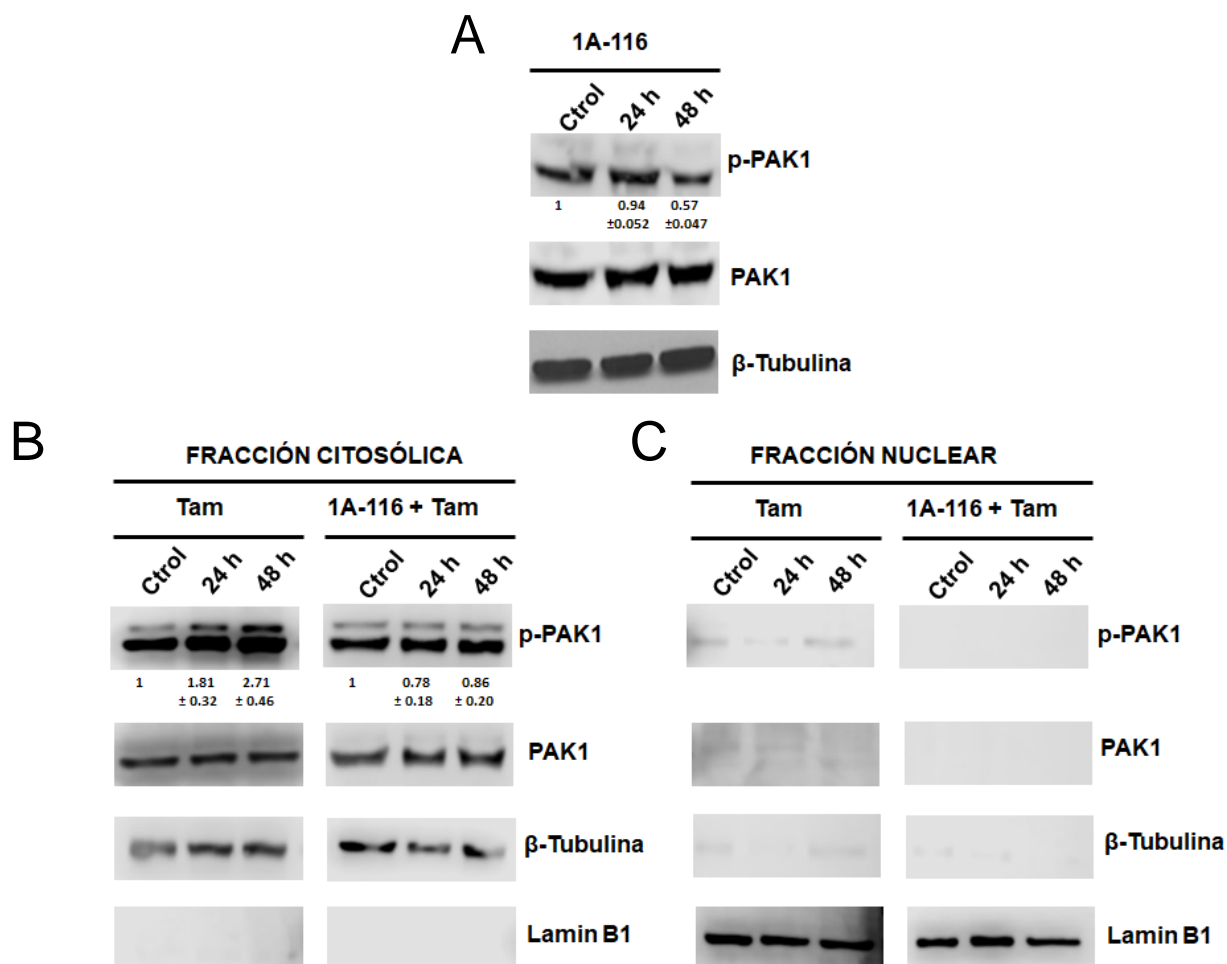


Figura 8: La fosforilación de PAK1 aumenta en respuesta a Tam y su traslocación nuclear es inhibida por 1A-116. Las células MCF7::C1199 se trataron con A) 1A-116 (4 μ M), B-C) Tam (1 μ M) o combinación de ambos durante diferentes tiempos. Se realizó un fraccionamiento subcelular para generar fracciones B) citosólicas y C) nucleares. Se detectaron los niveles de fosfo-PAK1 y PAK1 mediante western blot. Se muestran los valores de media densitométrica \pm de S.E.M de fosfo-PAK1 relativizados a los niveles totales de PAK1 (unidades arbitrarias, tomando el tratamiento control como 1). Se detectaron β -Tubulina y Lamin B1 como control de carga de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente.

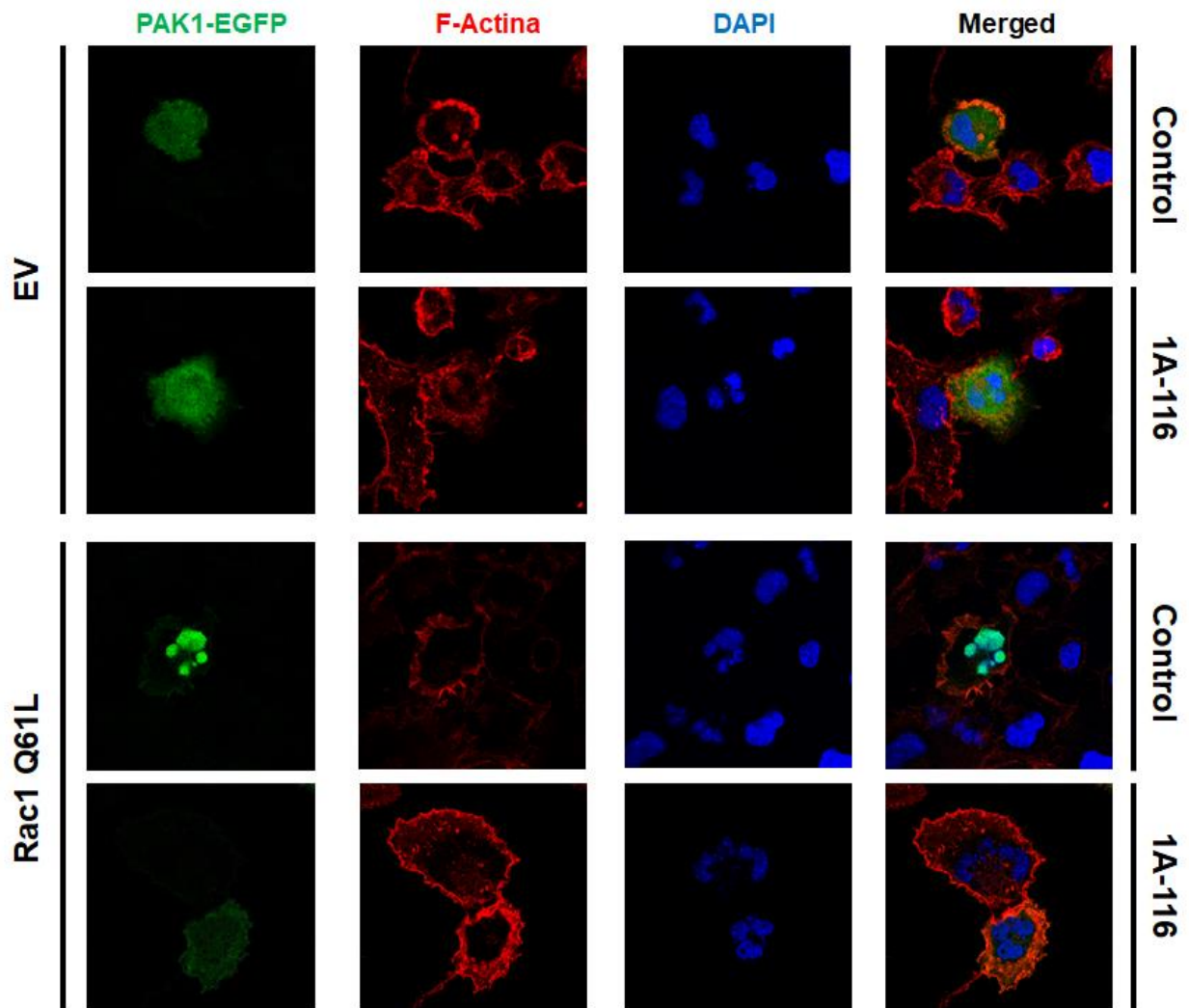


Figura 9: 1A-116 inhibe la traslocación nuclear de PAK1 mediada por Rac1. Células COS-1 co-transfectadas con el plásmido pNM42 (Rac1 Q61L) o el vector vacío pEGFP-C1 (EV, como control), junto con el plásmido PAK1-EGFP y creciendo sobre cubreobjetos recubiertos de poli-lisina, se trataron con vehículo (Control) o 1A-116 50 μM durante 24 h. Para visualizar el citoesqueleto de F-actina y los núcleos, las células fueron teñidas con Alexa Fluor 555 conjugado a faloidina y DAPI, respectivamente. Las preparaciones teñidas se analizaron por microscopía confocal utilizando un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo de 63X (Leica).

Finalmente, evaluamos los niveles de fosforilación de Ser305 de ER (p-Ser305 ER) en los modelos MCF7. La sobreactivación de Rac1 provocó un aumento en los niveles de p-Ser305 ER en las células MCF7::C1199, hecho demostrado tanto por western blot (Figura 10A) como por citometría de flujo (Figura 10B). En consecuencia, evaluamos los efectos de Tam y 1A-116 en la modulación de los niveles de fosforilación de este aminoácido. Como se muestra en la Figura 10C, p-Ser305 ER aumentó en respuesta al tratamiento con Tam y la presencia de 1A-116 revirtió dichos niveles.

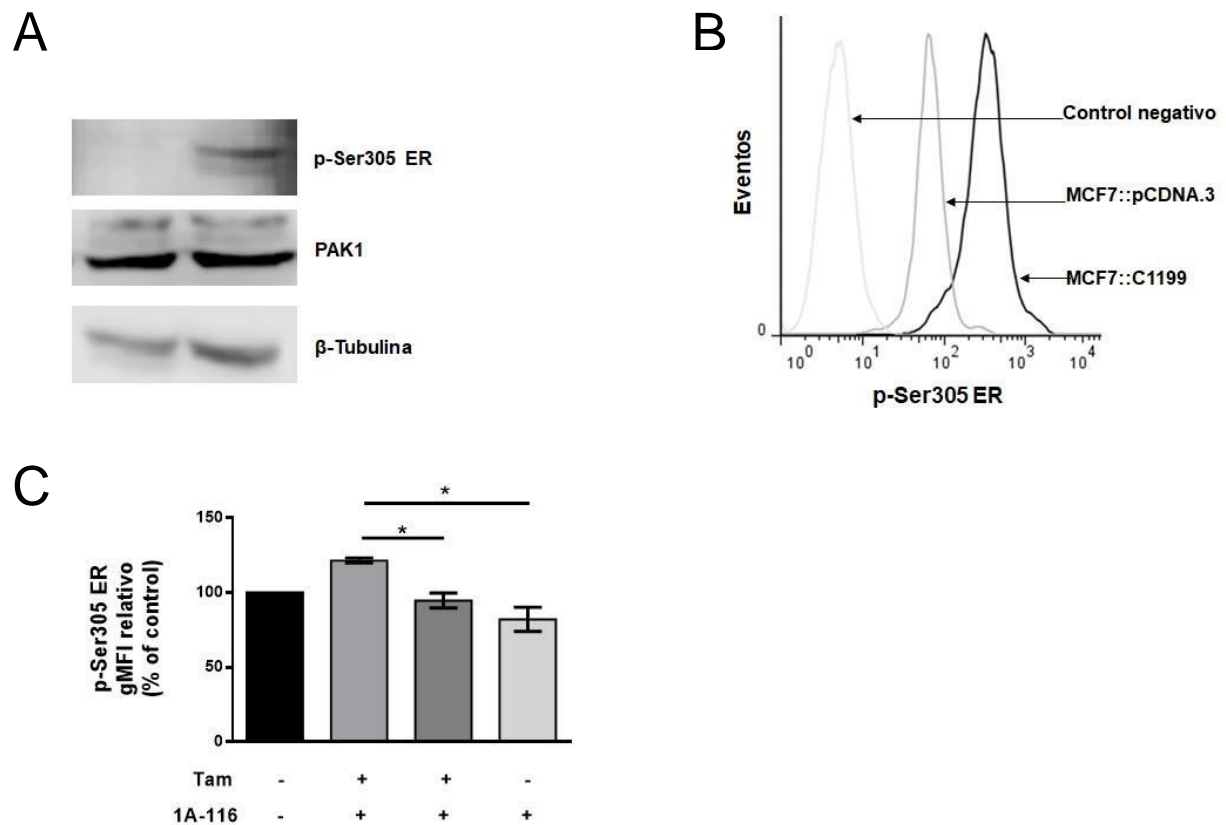


Figura 10: 1A-116 disminuye los niveles de p-Ser305 ER en respuesta al tratamiento con Tam. A) Lisados celulares de MCF7::pCDNA.3 y MCF7::C1199 fueron separados por SDS-PAGE y los niveles de p-Ser305 ER y PAK1 se detectaron mediante western blot. B) Los niveles de p-Ser305 ER se detectaron también mediante citometría de flujo en ambas líneas celulares. C) Se trataron células MCF7::C1199 con Tam (1 μ M), 1A-116 (4 μ M) o la combinación de ambos durante 24 h y se detectaron los niveles de p-Ser305 ER mediante citometría de flujo. La intensidad media geométrica de fluorescencia relativa (gMFI) de p-Ser305 ER se determinó como se describe en Materiales y métodos. Barras de error, S.E.M. ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, * $p < 0.05$ vs. Tam (tratamiento de estimulación).

La sobreactivación de Rac1 promueve un fenotipo altamente agresivo, incrementando la capacidad tumorigénica de células de cáncer de mama humano MCF7

La línea celular MCF7 se utiliza como modelo para estudiar tumores dependientes de estrógenos. Cuando se trasplantan a ratones inmunosuprimidos, estas células sólo forman tumores si se realiza una administración simultánea y sostenida de E₂ (157). Teniendo en cuenta esto, evaluamos la incidencia de prendimiento y generación de tumores subcutáneos de los modelos generados, sin la administración de E₂. Para ello, inoculamos 5x10⁶ células de manera subcutánea en el flanco derecho de ratones inmunosuprimidos (n=4 por cada modelo celular). Evaluamos diariamente el prendimiento por palpación y, en caso de resultar positivo, el volumen tumoral. Como era de esperar, las células MCF7::pCDNA.3 no fueron capaces de formar tumores en estos animales, bajo estas condiciones. Sin embargo, las células MCF7::C1199 mostraron un 75% de incidencia de prendimiento (al día 18 post-

inoculación), con una tasa de crecimiento de 114.4 ± 20.97 mm³/día (Figura 11 A). El análisis por citometría de flujo de homogenatos celulares de los tumores, revelaron que las células continuaban expresando la versión truncada de Tiam1 C1199 (Figura 11 C). Además, la totalidad de los ratones que generaron tumores (Figura 11 D), mostraron presencia de lesiones pulmonares espontáneos (Figura 11 E). Estos resultados nos muestran que la sobreactivación de Rac1, no solo provoca una transición de hormono-dependencia a hormono-independencia, sino que también promueve la adquisición de un fenotipo altamente agresivo con capacidad tumorigénica *in vivo*.

1A-116 tiene efecto anti-tumoral en un modelo de cáncer de mama con resistencia endócrina intrínseca

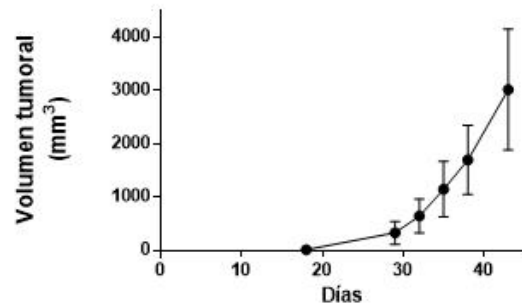
Los mecanismos de resistencia endócrina adquirida mostrados hasta ahora involucran modelos celulares pre-clínicos ER positivo y de resistencia adquirida. F3II es un modelo de carcinoma mamario murino ER positivo que presenta una resistencia intrínseca a Tam. Por esta razón, utilizamos el modelo F3II para evaluar el efecto anti-tumoral del inhibidor 1A-116 como posible monoterapia. A pesar de que se encuentra por fuera del escenario de resistencia endócrina adquirida, este es un modelo pre-clínico interesante para estudiar el posible desempeño de 1A-116 como terapia para este subtipo molecular.

En primer lugar, evaluamos los niveles de activación de Rac1 en el modelo F3II. Como puede observarse en la Figura 12 A, esta línea celular presenta niveles considerables de Rac1 activo, aunque menores que los que presentan las células MCF7::C1199. Al evaluar los efectos de 1A-116 sobre células F3II, observamos que este compuesto mostró un efecto anti-proliferativo concentración-dependiente y una IC₅₀ de 10 µM (Figura 12 B). Por otro lado, las células F3II presentan un fenotipo hormono-independiente y Tam resistente al no variar su capacidad proliferativa frente al estímulo de E2 (Figura 12 C) o el tratamiento con Tam (Figura 12 D).

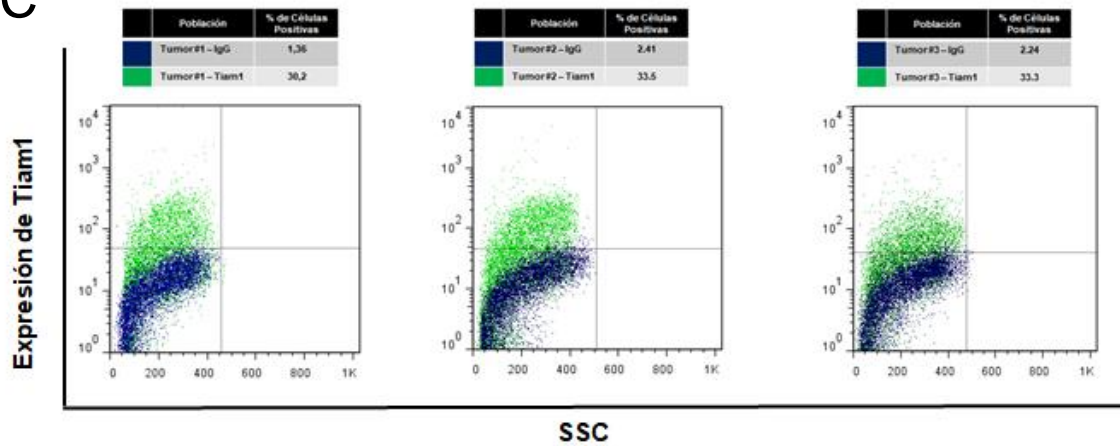
A

Línea celular	Incidencia	Tasa de crecimiento (mm ³ /día)
MCF7::pCNDNA.3	0% (0/4)	-
MCF7::C1199	75% (3/4)	114.4 ± 20.97

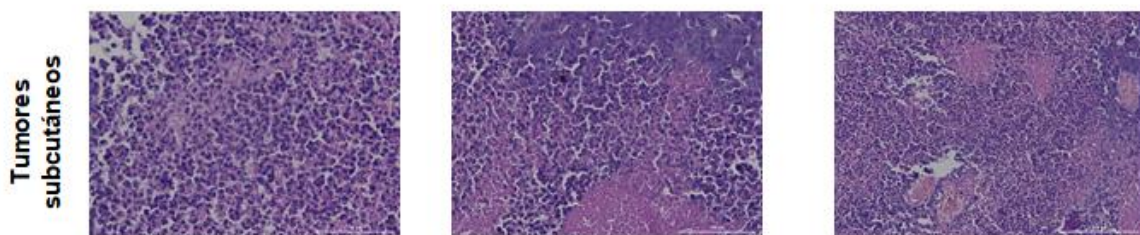
B



C



D



E

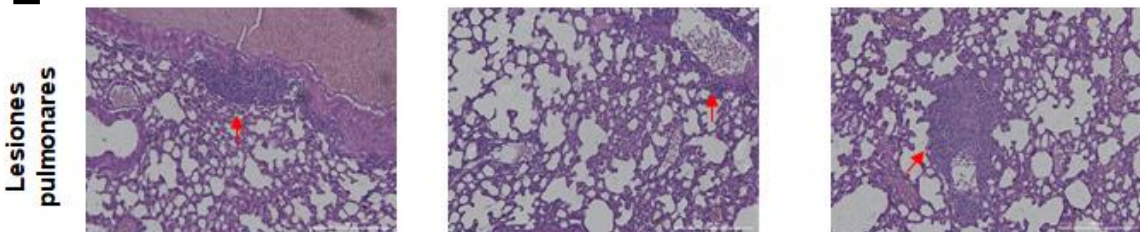


Figura 11: La sobreactivación de Rac1 incrementa la capacidad tumorigénica de MCF7. A) Se inocularon 5×10^6 células MCF7::pCNDNA.3 y MCF7::C1199 de manera subcutánea en ratones inmunosuprimidos ($n=4$ por cada línea celular) y se evaluó incidencia de prendimiento tumoral. **B)** Se midió diariamente el volumen de los tumores MCF7::C1199 y se determinó el volumen tumoral medio para poder calcular la tasa de crecimiento tumoral (en mm³/día). Al día 42, los ratones fueron sacrificados y diseccionados. Se removieron los pulmones, se los fijó en solución de Bouin y se determinó la presencia de lesiones pulmonares, utilizando una lupa de disección. **C)** Citometría de flujo realizada sobre homogenatos de los tumores generados para detectar la expresión de Tiam1. **D)** Histología de los tumores subcutáneos y las lesiones pulmonares **(E)** de MCF7::C1199, teñidos con H&E. Se muestran microfotografías representativas (63X). Las flechas rojas muestran las lesiones pulmonares.

Por último, estudiamos el efecto anti-tumoral *in vivo* del inhibidor 1A-116 en este modelo. Para ello, inoculamos de forma subcutánea 2×10^5 células F3II en el flanco de ratones hembras singénicas BalB/c y al día siguiente comenzamos el tratamiento diario con una dosis de 10 mg/kg/día de 1A-116 (o vehículo para el grupo control). Como se muestra en la Figura 13 A, el tratamiento con 1A-116 logró una disminución del 40% en el volumen tumoral medio en comparación con el grupo control (Día 35 post-inoculación, 1706 mm^3 vs. 990 mm^3 control vs. 1A-116). Los tumores tratados con 1A-116 mostraron también una tasa de crecimiento menor en comparación con el grupo control (64.12 ± 4.748 vs. $38.76 \pm 4.890 \text{ mm}^3/\text{día}$) (Figura 13 B). Por último, como se observa en la Figura 13 C, el tratamiento con 1A-116 provocó un aumento en la supervivencia global de los animales tratados en comparación con el grupo control (log rank $p=0.0257$; mediana de supervivencia global 35 vs. 47 días, control vs. 1A-116). Estos resultados nos muestran que 1A-116 también presenta un efecto anti-tumoral en un modelo de cáncer de mama de resistencia intrínseca a Tam.

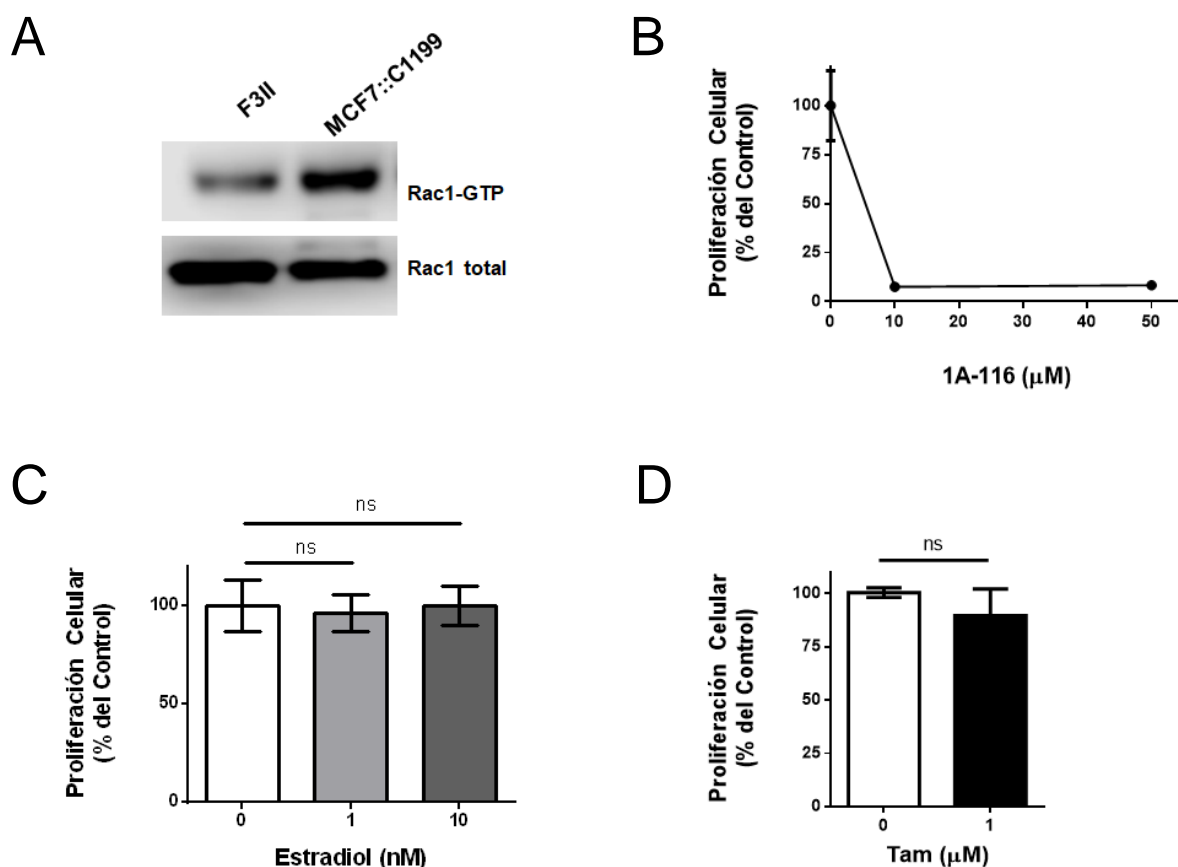


Figura 12: 1A-116 tiene efecto anti-proliferativo en un modelo de cáncer de mama de resistencia endócrina intrínseca. **A**) Las células F3II mostraron niveles considerables de activación de Rac1 (en comparación con la línea MCF7::C1199). Lisados celulares de F3II y MCF7::C1199 creciendo en condiciones normales fueron separados mediante SDS-PAGE y los niveles de activación de Rac1 fueron detectados mediante western blot. **B**) Se trataron durante 72 h células F3II con diferentes concentraciones de **B**) 1A-116, **C**) E2 y **D**) Tam y se analizó la proliferación celular mediante el método colorimétrico de cristal violeta. Barras, S.E.M. Unpaired t test; ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test; ns, diferencias no significativas vs. control. Los resultados están expresados como porcentaje del control y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

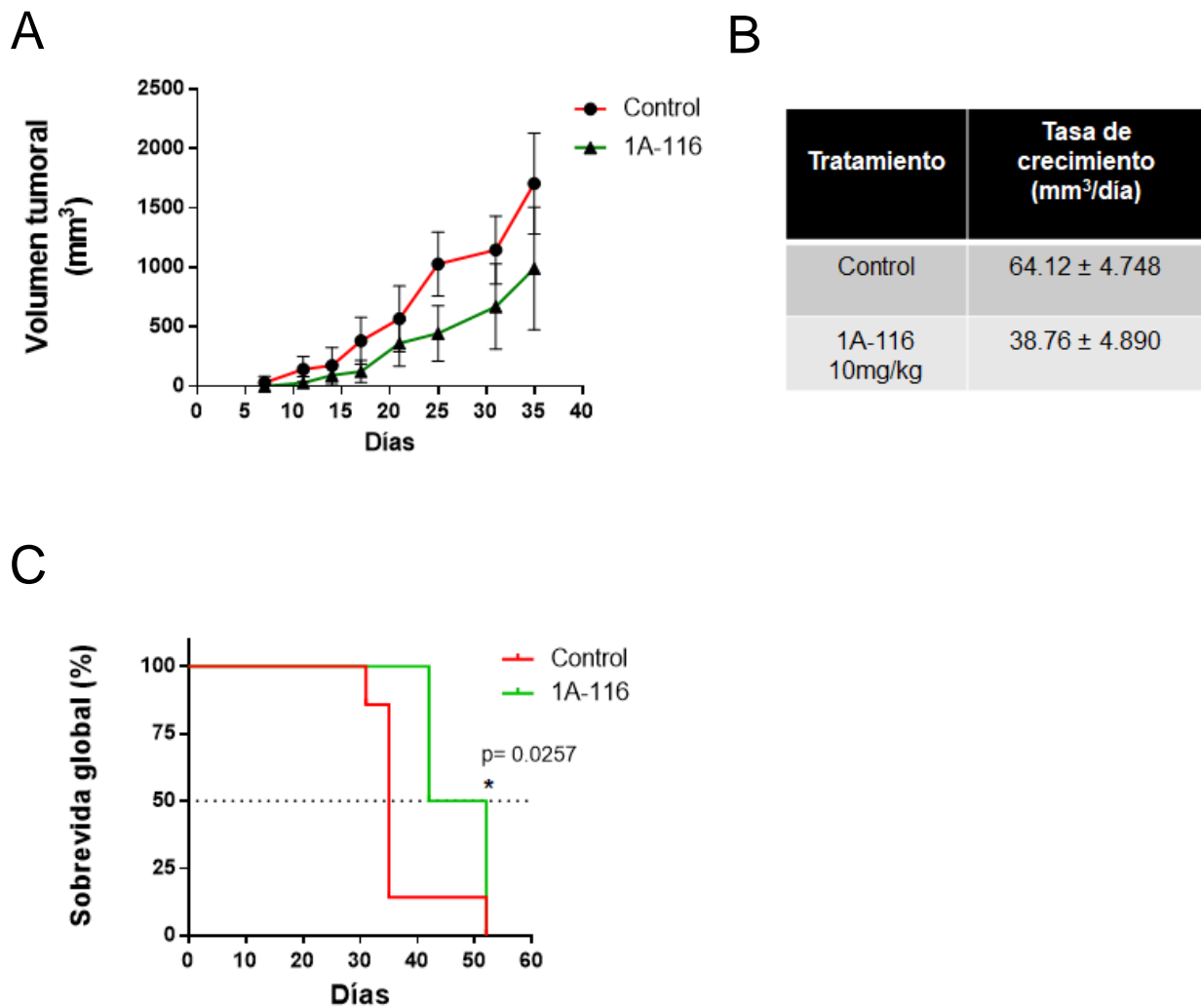


Figura 13: 1A-116 inhibe el crecimiento tumoral de células F3II in vivo, aumentando la sobrevida global. Se inocularon 2×10^5 células F3II de manera subcutánea en el flanco de ratones hembras singénicas BalB/c y se trataron diariamente con vehículo (control) o 1A-116 10mg/kg. **A)** Se determinó el volumen tumoral medio y **B)** tasas de crecimiento tumoral ($\text{mm}^3/\text{día}$). Cuando alguno de los tumores alcanzó un volumen de 1500 mm^3 , se procedió a interrumpir los tratamientos, sacrificando el resto de los animales cuando alcanzaban ese valor de corte. **C)** Análisis de sobrevida global. log rank $p=0.0257$; mediana de sobrevida global 35 vs. 47 días, control vs. 1A-116.

Conclusiones Parciales – Capítulo III B

- Se generó el modelo MCF7::C1199 por transfección estable del activador de tipo GEF de Rac1 Tiam1, que presenta una sobreactivación de Rac1.
- La sobreactivación de Rac1 en células MCF7::C1199 provocó:
 - un aumento en la capacidad migratoria y en la tasa de proliferación.
 - el desarrollo de un fenotipo hormono-independiente y resistente a Tam.
 - un aumento en los niveles de fosforilación de Ser305 de ER y una traslocación nuclear de PAK1, el principal efector de Rac1.
 - la adquisición de un fenotipo altamente tumorigénico.
- El tratamiento de células MCF7::C1199 resistentes a Tam con 1A-116 provocó:
 - un aumento del efecto anti-proliferativo de dicho inhibidor.
 - la restauración del efecto anti-proliferativo de Tam..
 - inhibición de los mecanismos Rac1-dependiente de resistencia a Tam, al disminuir los niveles de fosforilación de Ser305 y la traslocación nuclear de PAK1.
- El tratamiento con 1A-116 de células F3II con resistencia endócrina intrínseca, provocó una disminución en la proliferación celular *in vitro* e inhibió el crecimiento tumoral *in vivo*, provocando un aumento en la supervivencia global de los ratones tratados.

Discusión Parcial - Capítulo III A-B

Existen varios tipos de terapias endócrinas que actúan explotando la dependencia hormonal de los tumores mamarios, en base al estadio tumoral, la fase de la menopausia o la presencia de enfermedades concomitantes. De esta manera, al utilizar estos tratamientos se disminuye el crecimiento de los tumores hormono-dependientes, bloqueando la producción de estrógenos o interfiriendo con sus efectos pro-proliferativos. En la actualidad, los principales tipos de terapia endócrina que se utilizan en la clínica incluyen inhibidores de aromatasa (IAs), como anastrozol, letrozol o exemestano, que bloquean la enzima que produce estrógenos en los ovarios y en otros tejidos, afectando su síntesis y disminuyendo sus niveles; fulvestrant, el anti-estrógenos puro que inhibe y estimula la degradación del ER; agentes hormonales liberadores de hormona luteinizante (LHRH) que bloquean la actividad de los ovarios y evitan que produzcan estrógeno, provocando una menor disponibilidad de esta hormona para estimular el crecimiento tumoral. Los ejemplos incluyen goserelina, leuprolida y triptorelina (158). Por otro lado, los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) como el tamoxifeno (Tam) interfieren en la unión de estrógeno al ER, inhibiendo el crecimiento de las células tumorales.

La vía de señalización del ER comprende una red muy compleja que regula la actividad transcripcional de diferentes genes, a través de distintos mecanismos. La vía clásica o genómica involucra la unión de estrógenos al ER, formando un complejo que trasloca al núcleo, uniéndose a regiones específicas del ADN conocidas como elementos respondedores de estrógenos (EREs) promoviendo de esta manera la proliferación celular y la expresión de genes de supervivencia como *MYC* o *CycD1* (159). Existe también un mecanismo de acción genómico no-clásico que implica la unión del ER, a través de interacciones proteína-proteína, con factores de transcripción o co-reguladores. Esto posibilita la transcripción de genes que no poseen EREs, al permitir la unión indirecta del ER al ADN (160). Por otro lado, en ausencia de estrógenos, puede ser activada una vía ligando-independiente, en la que el ER interactúa con otros factores transcripcionales, fomentando la expresión génica. Además, existen vías no-genómicas en las que diferentes RTKs pueden activar al ER por interacciones proteína-proteína, en ausencia de estrógenos. De esta manera, el ER puede activar diferentes proteínas citosólicas o factores transcripcionales (28, 160).

El uso clínico de los tratamientos endócrinos ha mejorado significativamente la supervivencia en pacientes con cáncer de mama. Desafortunadamente, a pesar de su éxito y sus bajos efectos secundarios, el desarrollo de mecanismos de resistencia sigue siendo un problema importante y un gran porcentaje de pacientes tratados con terapias endócrinas eventualmente desarrollarán algún tipo de resistencia, provocando la progresión de la enfermedad.

Los mecanismos de resistencia de novo o intrínseca se describen para el grupo de pacientes que pierden o disminuyen la expresión del ER o presentan mutaciones en el citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*), que convierte a Tamoxifeno a su metabolito activo. Sin embargo, el tipo de resistencia endócrina más común lo conforma la resistencia adquirida. Debido a la complejidad que presenta la vía de señalización del ER, existen numerosos mecanismos asociados a este tipo de resistencia, que involucran cambios en la expresión y activación de proteínas reguladoras del ciclo celular o de vías de señalización que le permiten a la célula neoplásica escapar de los efectos antitumorales de la terapia endócrina. En este sentido, la sobreexpresión del EGFR, HER2, o IGF-I activa proteínas efectoras como AKT y MAPK, que en consecuencia modulan el normal funcionamiento de la vía del ER, provocando mecanismos de resistencia (161). En línea con esto, la vía PI3K/AKT/mTOR se encuentra implicada en el desarrollo de resistencia endócrina, en el que AKT estimula la vía del ER de manera ligando-independiente (40, 68, 162, 163).

Hemos descrito con exhaustividad las funciones biológicas de la GTPasa Rac1 que al regular la organización del citoesqueleto de actina, afecta diferentes procesos celulares como adhesión, migración, transcripción génica o progresión del ciclo celular. A su vez, hemos mencionado en detalle los numerosos estudios que evidencian que la actividad aberrante de esta proteína resulta en cuadros patológicos no solo en cáncer sino que también en desórdenes neuronales o cirrosis (164). En este contexto, la vía de señalización de Rac1 ha sido propuesta como uno de los mecanismos más importantes en el desarrollo de resistencia adquirida a terapias endócrinas en cáncer de mama. Uno de los primeros indicios de las implicancias de Rac1 en resistencia se observó al sobreexpresar una versión constitutivamente activa de Rac1 en células de cáncer de mama ER positivas. En línea con esta evidencia, la sobreexpresión de AND-34/BCAR3 en líneas celulares de cáncer de mama, con la subsecuente activación del eje Rac1-PAK1, también provocó mecanismos de resistencia endócrina (95). Además, la inhibición de Rac1 mostró efectos anti-proliferativos en líneas ER positivas y tamoxifeno resistentes (96).

El modelo celular MCF7-LTED de la línea celular ER positiva MCF7 es un modelo sumamente popular de privación prolongada de estrógenos, en el que se intenta recapitular los efectos del tratamiento con inhibidores de aromatasa. Cedido gentilmente por el Laboratorio del Dr. Pujana (IDIBELL), de Barcelona (España), este modelo se estableció al cultivar durante aproximadamente 12 meses las células MCF7 en un medio de cultivo privado de E2, como se había descrito antes (165-170). Este grupo demostró que el activador de tipo GEF de Rac1 Vav3 es un componente importante en la adquisición de un fenotipo resistente (103).

Utilizando este modelo celular, no solo mostramos que efectivamente resultaba ser resistente al tratamiento con diferentes IAs, como anastrozol o letrozol, sino que presentaba una sobreexpresión de los niveles de ER y sobreactivación de ERK1/2, en comparación con el modelo *wild type*. En este sentido, la sobreactivación de la vía de señalización de las MAPKs, por parte de receptores de membrana como IGFR1 o EGFR, puede dar como resultado la fosforilación independiente de estrógenos y la activación de ER (171). Se ha demostrado que la activación por parte del IGFR1 puede activar también la vía de PI3K/mTOR y estudios preclínicos sugieren que la desregulación de la vía de señalización de IGF-1 promueve la transformación, proliferación y desarrollo de metástasis de células de cáncer de mama (172). La inhibición de la vía de mTOR ha mostrado grandes resultados clínicos en pacientes resistentes a IAs no esteroides, como anastrozol o letrozol. Everolimus recibió la primera aprobación de la clase de medicamentos conocidos como inhibidores de mTOR para el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2 negativo o avanzado localmente. Este inhibidor mostró mejoras en supervivencia libre de progresión, en combinación con exemestano, aunque no haya mostrado un aumento en la supervivencia global. Este resultado podría explicarse a una activación aberrante de AKT por retroalimentación como resultado de la inhibición de mTOR, limitando la eficacia de everolimus (163, 173-175).

Por otro lado, al analizar el *status* de activación de Rac1, pudimos observar que los niveles de Rac1 activo eran mayores en el modelo MCF7-LTED y que estas células resultaban ser más sensibles al tratamiento con el inhibidor 1A-116. Hasta el momento de publicación de este trabajo, la sobreactivación de Rac1 en un modelo LTED de cáncer de mama nunca antes había sido descrita, por lo que decidimos evaluar la combinación de 1A-116 con anastrozol y letrozol, como potencial estrategia terapéutica para revertir los mecanismos de resistencia a estos tratamientos. En este contexto, la combinación de 1A-116 con estos IAs logró restaurar los efectos anti-proliferativos de estas drogas. El mecanismo molecular subyacente a este efecto podría explicarse en base a la inhibición de la vía de ERK1/2 por parte de esta estrategia combinada. Demostramos que al tratar células MCF7-LTED con anastrozol o letrozol, los niveles de activación de la vía aumentan y que el tratamiento con 1A-116 o en combinación con estos IAs logra disminuirlos. En la actualidad, numerosos ensayos clínicos estudian enfoques más potentes para inhibir la vía PI3K/AKT/mTOR, además de la utilización de inhibidores de CDK4 y CDK6 (176). Estas quinasas dependientes de ciclina controlan la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular, activando principalmente la proteína del retinoblastoma Rb que, al fosforilarse, ve inhibida sus propiedades supresoras de crecimiento. Los inhibidores selectivos de CDK4/CDK6 como palbociclib, ribociclib o ademaciclib provocan la disminución de los niveles de fosforilación de Rb, resultando en una inhibición de la progresión del ciclo celular en la

fase G1, evitando la proliferación celular. En concordancia con el rol descrito para Rac1 como promotor de progresión del ciclo celular a través de la fase G1 (177-179), se ha demostrado que la inhibición de esta GTPasa provoca un arresto celular en fase G1/G0 en células de cáncer de mama Rb-positivas(180). Cabe mencionar que para que los inhibidores de CDK4/CDK6 sean eficaces, es necesario que las células cancerosas presenten la versión *wild type* de Rb. Sin embargo, a pesar de que la inhibición de Rac1 no provoca cambios en la progresión del ciclo celular en células deficientes de Rb, sí provoca la inducción de apoptosis en estas células. En este sentido, 1A-116 ha demostrado provocar arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis (91, 92), reforzando la idea de utilizar inhibidores de Rac1 como potenciales estrategias terapéuticas a la adquisición de resistencia a IAs, vía inhibición del eje CDK4/CDK6-Rb, independientemente de la presencia o ausencia de Rb.

El tratamiento con tamoxifeno es utilizado ampliamente desde hace décadas y se recomienda en la actualidad para pacientes ER positivas pre-menopáusicas. Sin embargo, a pesar de sus bajos efectos adversos y sus favorables resultados, la adquisición de resistencia a tamoxifeno es una preocupación de gran relevancia clínica. Con el objetivo de evaluar los mecanismos moleculares de resistencia a esta droga, mediados por la sobreactivación de la vía de Rac1, establecimos un modelo celular que presentaba sobreexpresada una versión constitutivamente activa del activador de tipo GEF de Rac1 Tiam1. El modelo MCF7::C1199 generado presentó subsecuentemente niveles de activación de Rac1 aumentados. Esto provocó cambios fenotípicos en las células, característicos de la sobreactivación de Rac1, como un aumento en la formación de lamelipodios y en la capacidad migratoria de estas células. Además, en línea con estudios que mostraron el rol de Rac1 en la promoción de la progresión del ciclo celular, el modelo MCF7::C1199 vio aumentada su tasa de proliferación, en comparación con la línea control MCF7::pCDNA.3.

La expresión del ER es un hecho determinante para elegir terapias endócrinas como tratamientos adyuvantes. El modelo celular MCF7::C1199 no mostró cambios en los niveles de expresión del ER, en comparación con la línea control. Sin embargo, las células MCF7::C1199 no respondieron al estímulo proliferativo de 17- β -Estradiol (E2), mostrando que la sobreactivación de Rac1 es capaz de promover la adquisición de un fenotipo hormono-independiente. Al evaluar el efecto anti-proliferativo de tamoxifeno en los modelos generados, mostramos que la sobreactivación de Rac1 no solo promueve la adquisición de un fenotipo hormono-independiente, sino que también provoca la adquisición de resistencia a tamoxifeno, ya que la capacidad proliferativa de las células MCF7::C1199 no se vio alterada por este tratamiento. Esto está en concordancia con la evidencia de que las modificaciones en las células de cáncer de mama que promueven la progresión de un fenotipo hormono-dependiente a uno hormono-independiente pueden alterar la respuesta a las terapias

endócrinas (181).

Como ya se ha mencionado, en los casos en los que Tam es inicialmente efectivo, otras vías de señalización terminan activándose, volviendo ineficaz este tratamiento. Una vez que los tumores desarrollan resistencia a Tam, adquieren un fenotipo mucho más agresivo que correlaciona con un peor pronóstico clínico. Por esta razón, la utilización de nuevas terapias dirigidas en combinación con Tam se postula también como un enfoque alternativo en los casos en los que la adquisición de resistencia se torne inevitable.

En este trabajo, evaluamos la capacidad del inhibidor 1A-116 de provocar un efecto anti-proliferativo en el modelo resistente a Tam. En primer lugar, observamos que 1A-116 provocaba un mayor efecto anti-proliferativo en la línea resistente. Luego, y en total concordancia con resultados previos en los que la inhibición de Rac1 podía revertir la resistencia a Tam (96), 1A-116 restablece los efectos anti-proliferativos de Tam.

La quinasa PAK1 es uno de los principales efectores de Rac1, acoplado a esta GTPasa con diferentes vías de señalización. La sobreexpresión y/o sobreactivación de PAK1 provoca un aumento en la migración e invasión de células de cáncer de mama. Esta quinasa juega un rol clave en la transformación maligna, promoviendo la supervivencia celular y la capacidad proliferativa en varios tipos de cáncer, como cáncer de mama, próstata, ovario y colorectal. Además, se encuentra sobreactivada en aproximadamente el 50% de los tumores mamarios humanos y sus niveles de expresión correlacionan con la agresividad en estos pacientes (182).

En los últimos años, numerosos trabajos han demostrado que PAK1 se encuentra involucrada en el desarrollo de resistencia a Tam en cáncer de mama. La activación de PAK1 y la subsecuente translocación a núcleo ha sido asociada con un peor pronóstico, repercutiendo negativamente en la respuesta a Tam (102, 183-185). Esto, sumado al análisis de los perfiles de expresión génica de PAK1 que realizamos en este trabajo, sugeriría el papel de PAK1 como predictor de recurrencia y desarrollo de resistencia a Tam. En este trabajo demostramos que las células resistentes MCF7::C1199 presentan niveles citosólicos aumentados de PAK1 fosforilado (activo), debido a la sobreactivación de Rac1 y en respuesta al tratamiento con Tam. Sin embargo, el tratamiento con 1A-116 interfirió con la activación de PAK1, inhibiendo además su translocación a núcleo. Esto se pudo demostrar mediante técnicas de fraccionamiento sub-celular y de microscopía confocal.

Como ya hemos mencionado, la sobreactivación de la vía de señalización Rac1-PAK1 se ha convertido en un mecanismo de resistencia a Tam sumamente importante. PAK1 es capaz de fosforilar el residuo Ser305 en el N-terminal del ER, promoviendo hiperplasia en el

epitelio mamario (186). A su vez, la fosforilación de Ser305 de ER, mediada por PAK1, puede transactivar y fosforilar otro residuo del ER, la Ser118, promoviendo una vez más la independencia hormonal y el desarrollo de resistencia a Tam (60, 98). A pesar de que existen discrepancias en cuanto al valor predictivo de respuesta que tienen los sitios de fosforilación del ER, la fosforilación en el residuo Ser305 por PAK1 es el único sitio que ha sido correlacionado con resistencia a Tam (cita 45 paper tiam1). Más aún, la presencia nuclear de PAK1 junto con la fosforilación de Ser305 del ER está asociada a una respuesta atenuada a Tam (27, 102, 187, 188). Esta asociación entre la localización sub-celular de PAK1 y el status de fosforilación en la Ser305 es independiente del grado clínico del tumor, o del estado menopáusico de la paciente. El resultado del análisis de los perfiles de expresión de PAK1 en los pacientes ER positivos mostrados anteriormente también fue independiente de este estado hormonal (Datos no mostrados).

Una posible explicación al mecanismo de resistencia mediado por la fosforilación de la Ser305 del ER fue realizada por de Leeuw et. al (59), quienes demostraron que esta modificación post-traduccional le confiere un arresto conformacional único al ER, en donde Tam no puede promover la inactivación del receptor, a pesar de poder unirse a él. En línea con esta observación, las células resistentes MCF7::C1199 presentaron niveles aumentados de fosforilación de Ser305, en comparación con las células control. Este hecho demuestra que la sobreactivación de Rac1 promueve un aumento de los niveles de fosforilación de Ser305. Además, pudimos demostrar que en las células MCF7::C1199 los niveles de fosforilación de este residuo aumentaron en respuesta al tratamiento con Tam y que la inhibición de Rac1 mediada por 1A-116 logró revertir este mecanismo de resistencia.

El modelo MCF7::C1199 mostró propiedades altamente agresivas y un fenotipo resistente a Tam debido a la sobreactivación de Rac1. La malignidad y agresividad de una línea celular puede ser testada *in vivo* a través de un ensayo de toma e incidencia de formación de tumores. Nuestros resultados muestran que la sobreactivación de Rac1 provocó que las células MCF7::C1199 fueran capaces de desarrollar tumores subcutáneos. Se encuentra probado que las células MCF7 no poseen capacidad tumorigénica en ratones inmunosuprimidos, sin la estimulación exógena de estrógenos (59). En línea con este resultado, la línea control no fue capaz de desarrollar tumores bajo las mismas condiciones. Por otro lado, las características observadas en el perfil de crecimiento *in vivo* de la línea MCF7::C1199 fueron muy similares a las observadas para la línea hormono-independiente MDA-MB-231 (datos no mostrados). El análisis por citometría de flujo de las células de los tumores mostró que la totalidad de ellos continuaban expresando la versión activa de Tiam1 al momento de sacrificio de los animales. Este hecho, sumado a que la línea MCF7::C1199 fue capaz de provocar lesiones espontáneas en pulmón, refuerzan el rol de Rac1 como

potencial blanco terapéutico en resistencia endócrina. En estudios futuros se evaluarán si se trata de focos metastásicos, a través marcaje con citoqueratinas específicas de mama. Estos resultados alientan la prueba *in vivo* de los efectos de 1A-116 sobre la progresión de tumores MCF7::C1199, con vistas a determinar diferentes esquemas de combinación con Tam y evaluar la reversión del fenotipo resistente observado *in vitro*.

Finalmente, teniendo en cuenta que los modelos pre-clínicos evaluados correlacionaban con el desarrollo de resistencia adquirida a los tratamientos endócrinos, decidimos utilizar la línea celular de cáncer de mama murino F3II como modelo de resistencia endócrina intrínseca a Tam. Esta línea celular presenta expresión del ER (189) pero resulta ser hormono-independiente, ya que no ve alterada su capacidad proliferativa en respuesta al estímulo con estrógenos. Además, este modelo resultó ser resistente al tratamiento con Tam.

El modelo celular F3II presenta niveles considerables de activación de Rac1, siendo altamente sensible al tratamiento con el inhibidor 1A-116 y mostrando una IC50 en el rango micromolar bajo. A su vez, el tratamiento con 1A-116 *in vivo* de ratones singénicos portadores de tumores subcutáneos F3II logró reducir la tasa de crecimiento tumoral y extender la supervivencia de estos animales. Uno de los mecanismos descritos más comunes para la aparición de un fenotipo resistente intrínseco lo conforma la expresión de versiones truncas o no funcionales del ER. En este sentido, los resultados obtenidos por nuestro grupo y por otros grupos de investigación permitirían hipotetizar que la hormono-independencia de la línea F3II, y la consecuente resistencia intrínseca a Tam, tienen su fundamento en este mecanismo. Los efectos anti-tumorales mostrados por 1A-116 en el modelo F3II alientan la potencial utilización de este inhibidor como tratamiento para este tipo de tumores.

A modo de resumen, pudimos demostrar las implicancias de la GTPasa Rac1 en el desarrollo de resistencia adquirida a diferentes tratamientos endócrinos, como los IAs anastrozol y letrozol; y el modulador selectivo del ER, tamoxifeno. La participación de Rac1 en el mecanismo de resistencia adquirida postula a esta proteína como un blanco terapéutico relevante para lograr una respuesta anti-tumoral favorable. En conjunto, los resultados obtenidos apuntan al entendimiento de los mecanismos asociados a la biología tumoral y a la utilización del inhibidor 1A-116 como agente capaz de actuar sobre los mecanismos de resistencia a terapias endócrinas, con el objetivo final de desarrollar estrategias terapéuticas selectivas para evitar la progresión de cáncer mamario ER positivo.

CONCLUSIONES FINALES

Durante la realización de este trabajo de investigación nos propusimos llevar adelante la caracterización del papel de la GTPasa Rac1 en los mecanismos moleculares relacionados con la resistencia a terapias endócrinas en cáncer de mama. Para este fin, utilizamos diferentes modelos celulares de cáncer de mama, demostrando que la inhibición de Rac1 logró revertir la resistencia endócrina.

En nuestro laboratorio desarrollamos un inhibidor farmacológico de Rac1, denominado 1A-116, que ha demostrado sus efectos anti-tumorales en diferentes tipos de cáncer. En este sentido, realizamos un estudio farmacodinámico de la interacción del inhibidor 1A-116 con la GTPasa Rac1, con el objetivo de comprender aún más los mecanismos por los cuales lleva a cabo sus efectos inhibitorios.

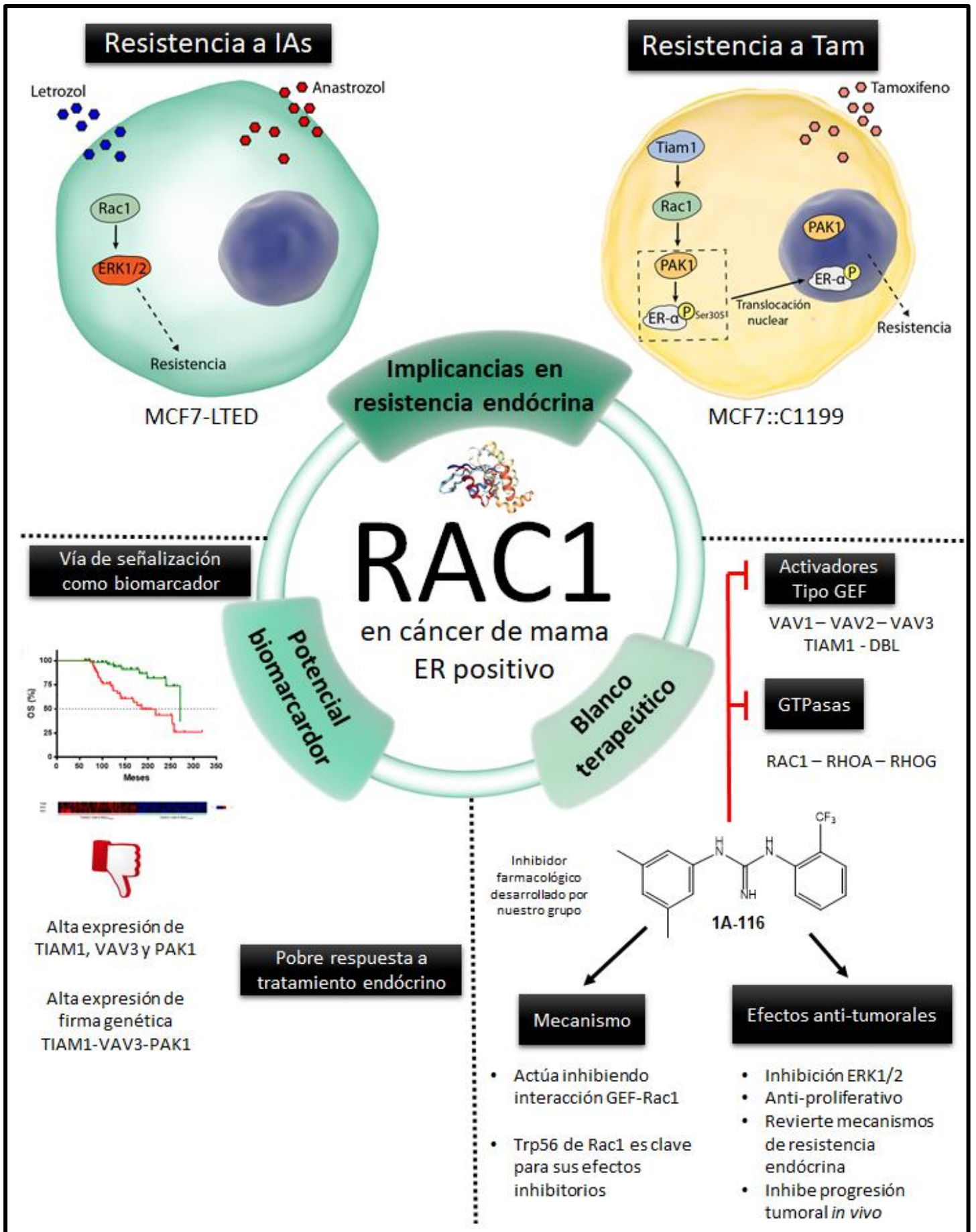
Por último, llevamos adelante un análisis bioinformático de bases de datos de muestras de pacientes de cáncer de mama, en dónde encontramos potenciales correlaciones entre la sobreexpresión de algunos integrantes de la vía de Rac1 y una pobre respuesta al tratamiento con terapias endócrinas.

En resumen, pudimos demostrar que:

- 1A-116 actúa interfiriendo con la actividad de Rac1 a nivel GEFs-Rac1, inhibiendo la actividad de diferentes GEFs como Vav1, Vav2, Vav3, Tiam1 y DBL.
- 1A-116 inhibe la actividad de las GTPasa Rac1, RhoA y RhoG
- El residuo aminoacídico W56 de Rac1 es imprescindible para que 1A-116 muestre sus efectos inhibitorios.
- 1A-116 inhibe procesos celulares regulados por Rac1, como la formación de *ruffles* y lamelipodios.
- La expresión de *TIAM1*, *VAV3*, *TRION* y *PAK1* se encuentra aumentada y la de *RALBP1* disminuida, en cáncer de mama ER positivo.
- la alta expresión de *TIAM1*, *VAV3* y *PAK1* correlacionan con un peor pronóstico en pacientes de cáncer de mama ER positivo tratados con terapia endócrina, mostrando un potencial uso de estos genes como marcadores de respuesta al tratamiento con terapias endócrinas.
- Las células MCF7-LTED resistentes a IAs presentan una sobreexpresión del ER y un aumento en los niveles de activación de ERK1/2 y de Rac1.

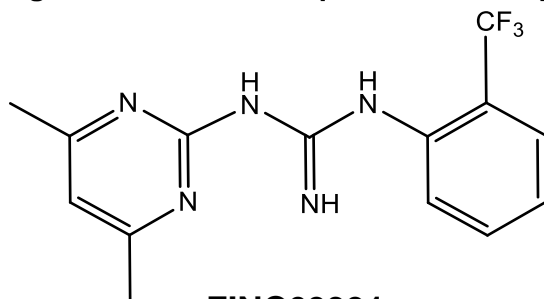
- Las células MCF7-LTED presentan una mayor sensibilidad a la inhibición de Rac1 mediante el tratamiento con 1A-116.
- La combinación de 1A-116 con anastrozol o letrozol disminuye los niveles de activación de ERK1/2 y revierte la resistencia a estos IAs.
- La sobreactivación de Rac1 en células MCF7::C1199 provocó:
 - un aumento en la capacidad migratoria y en la tasa de proliferación.
 - el desarrollo de un fenotipo hormono-independiente y resistente a Tam.
 - un aumento en los niveles de fosforilación de Ser305 de ER y una traslocación nuclear de PAK1.
 - la adquisición de un fenotipo altamente tumorigénico.
- El tratamiento de células MCF7::C1199 resistentes a Tam con 1A-116 provocó:
 - la restauración del efecto anti-proliferativo de Tam.
 - inhibición de los mecanismos Rac1-dependiente de resistencia a Tam, al disminuir los niveles de fosforilación de Ser305 y la traslocación nuclear de PAK1.
- El tratamiento con 1A-116 de células F3II con resistencia endócrina intrínseca provocó una disminución en la proliferación celular *in vitro* e inhibió el crecimiento tumoral *in vivo*, aumentando la supervivencia global de los ratones tratados.

En definitiva, la inhibición de Rac1 puede convertirse en un nuevo enfoque para restaurar la sensibilidad a terapias endócrinas en cáncer de mama resistente a estos tratamientos.



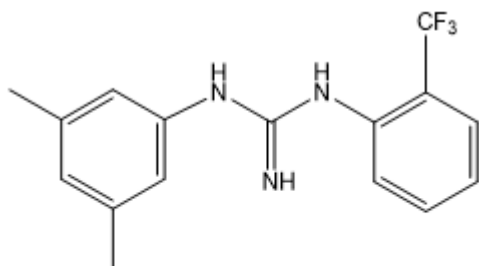
**MATERIAL
SUPPLEMENTARIO**

Figura S1: Estructura química del compuesto ZINC69391



ZINC69391
 $C_{14}H_{14}F_3N_5$
PM = 310.29

Figura S2: Estructura química del compuesto 1A-116



1A-116
 $C_{16}H_{16}F_3N_3$
PM = 307.31

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet] 2012.
2. Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, et al. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(10):2059-69. Epub 2000/05/16. doi: 10.1200/jco.2000.18.10.2059. PubMed PMID: 10811671.
3. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(2):93-9. doi: 10.3322/caac.21388. PubMed PMID: 28094848.
4. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical medicine insights Pathology*. 2015;8:23-31. doi: 10.4137/CPath.S31563. PubMed PMID: 26740749; PubMed Central PMCID: PMC4689326.
5. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74. doi: 10.1073/pnas.191367098. PubMed PMID: 11553815; PubMed Central PMCID: PMC58566.
6. Irigoyen MA, Garcia FV, Iturriagoitia AC, Beroiz BI, Martinez MS, Guillen Grima F. [Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*. 2011;34(2):219-33. PubMed PMID: 21904404.
7. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;45(3 Suppl):S116-24. PubMed PMID: 11511861.
8. Renoir JM, Marsaud V, Lazennec G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(4):449-65. doi: 10.1016/j.bcp.2012.10.018. PubMed PMID: 23103568.
9. Zhou W, Slingerland JM. Links between oestrogen receptor activation and proteolysis: relevance to hormone-regulated cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2013;14:26. doi: 10.1038/nrc3622.
10. Maggi A. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(8):1054-60. doi: 10.1016/j.bbdis.2011.05.001. PubMed PMID: 21605666; PubMed Central PMCID: PMC3121051.
11. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology*. 2005;19(4):833-42. doi: 10.1210/me.2004-0486. PubMed PMID: 15695368.
12. Zardavas D, Tryfonidis K, Goulioti T, Piccart M. Targeted adjuvant therapy in breast cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2016;16(12):1263-75. doi: 10.1080/14737140.2016.1247698. PubMed PMID: 27741402.
13. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0. PubMed PMID: 15894097.
14. Jinih M, Relihan N, Corrigan MA, O'Reilly S, Redmond HP. Extended Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer: Evidence and Update - A Review. *The breast journal*. 2017;23(6):694-705. doi: 10.1111/tbj.12783. PubMed PMID: 28252242.
15. Hulka BS, Wilcosky T. Biological markers in epidemiologic research. *Archives of environmental health*. 1988;43(2):83-9. doi: 10.1080/00039896.1988.9935831. PubMed PMID: 3377561.
16. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation.

- Translational cancer research. 2015;4(3):256-69. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04. PubMed PMID: 26213686; PubMed Central PMCID: PMC4511498.
17. Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. Expert review of molecular diagnostics. 2003;3(5):525-9. doi: 10.1586/14737159.3.5.525. PubMed PMID: 14510173.
 18. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. Molecular oncology. 2012;6(2):140-6. doi: 10.1016/j.molonc.2012.01.010. PubMed PMID: 22356776; PubMed Central PMCID: PMC5528374.
 19. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. The New England journal of medicine. 2005;353(16):1659-72. doi: 10.1056/NEJMoa052306. PubMed PMID: 16236737.
 20. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. The New England journal of medicine. 2001;344(11):783-92. Epub 2001/03/15. doi: 10.1056/nejm200103153441101. PubMed PMID: 11248153.
 21. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2009;360(14):1408-17. doi: 10.1056/NEJMoa0805019. PubMed PMID: 19339720.
 22. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. The New England journal of medicine. 2004;351(27):2817-26. doi: 10.1056/NEJMoa041588. PubMed PMID: 15591335.
 23. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. The New England journal of medicine. 2014;371(2):187-8. doi: 10.1056/NEJMc1405215. PubMed PMID: 25006736.
 24. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. Nature genetics. 2001;29(4):365-71. doi: 10.1038/ng1201-365. PubMed PMID: 11726920.
 25. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
 26. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nature genetics. 2003;34(3):267-73. doi: 10.1038/ng1180. PubMed PMID: 12808457.
 27. Bostner J, Skoog L, Fornander T, Nordenskjold B, Stal O. Estrogen receptor-alpha phosphorylation at serine 305, nuclear p21-activated kinase 1 expression, and response to tamoxifen in postmenopausal breast cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010;16(5):1624-33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1733. PubMed PMID: 20179234.
 28. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. Nature reviews Cancer. 2009;9(9):631-43. Epub 2009/08/25. doi: 10.1038/nrc2713. PubMed PMID: 19701242.
 29. Rondon-Lagos M, Villegas VE, Rangel N, Sanchez MC, Zaphiropoulos PG. Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. International journal of molecular sciences. 2016;17(8). doi: 10.3390/ijms17081357. PubMed PMID: 27548161; PubMed Central PMCID: PMC5000752.
 30. Fabian CJ. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. International Journal of Clinical Practice. 2007;61(12):2051-63. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01587.x. PubMed PMID: PMC2228389.
 31. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN, et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(3):619-29. doi: 10.1200/JCO.2005.09.121. PubMed PMID: 15545664.

32. Boccardo F, Guglielmini P, Bordonaro R, Fini A, Massidda B, Porpiglia M, et al. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: long term results of the Italian Tamoxifen Anastrozole trial. *European journal of cancer*. 2013;49(7):1546-54. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.025. PubMed PMID: 23415888.
33. Boccardo F, Rubagotti A, Guglielmini P, Fini A, Paladini G, Mesiti M, et al. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2006;17 Suppl 7:vii10-4. doi: 10.1093/annonc/mdl941. PubMed PMID: 16760270.
34. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(11):1081-92. doi: 10.1056/NEJMoa040331. PubMed PMID: 15014181.
35. Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones SE, et al. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;369(9561):559-70. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60200-1. PubMed PMID: 17307102.
36. Fallowfield LJ, Bliss JM, Porter LS, Price MH, Snowdon CF, Jones SE, et al. Quality of life in the intergroup exemestane study: a randomized trial of exemestane versus continued tamoxifen after 2 to 3 years of tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(6):910-7. doi: 10.1200/JCO.2005.03.3654. PubMed PMID: 16484701.
37. Kaufmann M, Jonat W, Hilfrich J, Eidtmann H, Gademann G, Zuna I, et al. Survival benefit of switching to anastrozole after 2 years' treatment with tamoxifen versus continued tamoxifen therapy: The ARNO 95 study. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(18_suppl):547-. doi: 10.1200/jco.2006.24.18_suppl.547.
38. Sobral AF, Amaral C, Correia-da-Silva G, Teixeira N. Unravelling exemestane: From biology to clinical prospects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2016;163:1-11. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.019. PubMed PMID: 26992705.
39. Ma CX, Reinert T, Chmielewska I, Ellis MJ. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(5):261-75. doi: 10.1038/nrc3920. PubMed PMID: 25907219.
40. Paplomata E, O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2014;6(4):154-66. Epub 2014/07/25. doi: 10.1177/1758834014530023. PubMed PMID: 25057302; PubMed Central PMCID: PMC4107712.
41. Arpino G, De Angelis C, Giuliano M, Giordano A, Falato C, De Laurentiis M, et al. Molecular mechanism and clinical implications of endocrine therapy resistance in breast cancer. *Oncology*. 2009;77 Suppl 1:23-37. doi: 10.1159/000258493. PubMed PMID: 20130429.
42. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocrine reviews*. 2008;29(2):217-33. doi: 10.1210/er.2006-0045. PubMed PMID: 18216219; PubMed Central PMCID: PMC2528847.
43. Zhou Y, Yau C, Gray JW, Chew K, Dairkee SH, Moore DH, et al. Enhanced NFκB and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7(1):59. doi: 10.1186/1471-2407-7-59.
44. Johnston SRD, Lu B, Scott GK, Kushner PJ, Smith IE, Dowsett M, et al. Increased Activator Protein-1 DNA Binding and c-Jun NH₂-Terminal Kinase Activity in Human Breast Tumors with Acquired Tamoxifen Resistance. *Clinical Cancer Research*. 1999;5(2):251-6.
45. Schiff R, Reddy P, Ahotupa M, Coronado-Heinsohn E, Grim M, Hilsenbeck SG, et al. Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(23):1926-34. PubMed PMID: 11106684.
46. Ramaswamy B, Lu Y, Teng KY, Nuovo G, Li X, Shapiro CL, et al. Hedgehog signaling is a novel

- therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer research*. 2012;72(19):5048-59. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1248. PubMed PMID: 22875023; PubMed Central PMCID: PMC3837449.
47. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy. *Current molecular medicine*. 2012;12(1):27-33. PubMed PMID: PMC3673714.
48. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(44):29897-903. doi: 10.1074/jbc.M804612200. PubMed PMID: 18708351; PubMed Central PMCID: PMC2573063.
49. Lu Y, Roy S, Nuovo G, Ramaswamy B, Miller T, Shapiro C, et al. Anti-microRNA-222 (anti-miR-222) and -181B suppress growth of tamoxifen-resistant xenografts in mouse by targeting TIMP3 protein and modulating mitogenic signal. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(49):42292-302. doi: 10.1074/jbc.M111.270926. PubMed PMID: 22009755; PubMed Central PMCID: PMC3234972.
50. Ward A, Shukla K, Balwierz A, Soons Z, Konig R, Sahin O, et al. MicroRNA-519a is a novel oncomir conferring tamoxifen resistance by targeting a network of tumour-suppressor genes in ER+ breast cancer. *The Journal of pathology*. 2014;233(4):368-79. doi: 10.1002/path.4363. PubMed PMID: 24752803; PubMed Central PMCID: PMC4298809.
51. Shi W, Gerster K, Alajez NM, Tsang J, Waldron L, Pintilie M, et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer research*. 2011;71(8):2926-37. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3369. PubMed PMID: 21393507.
52. Likhite VS, Stossi F, Kim K, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Molecular endocrinology*. 2006;20(12):3120-32. doi: 10.1210/me.2006-0068. PubMed PMID: 16945990.
53. Weitsman GE, Li L, Skliris GP, Davie JR, Ung K, Niu Y, et al. Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer research*. 2006;66(20):10162-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4111. PubMed PMID: 17047081.
54. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Kondo N, Kobayashi S, et al. Low phosphorylation of estrogen receptor alpha (ERalpha) serine 118 and high phosphorylation of ERalpha serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2008;15(3):755-63. doi: 10.1677/ERC-08-0078. PubMed PMID: 18550720.
55. Sarwar N, Kim JS, Jiang J, Peston D, Sinnett HD, Madden P, et al. Phosphorylation of ERalpha at serine 118 in primary breast cancer and in tamoxifen-resistant tumours is indicative of a complex role for ERalpha phosphorylation in breast cancer progression. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(3):851-61. doi: 10.1677/erc.1.01123. PubMed PMID: 16954434.
56. Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, Bouton AH. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer letters*. 2007;256(1):1-24. doi: 10.1016/j.canlet.2007.03.016. PubMed PMID: 17475399; PubMed Central PMCID: PMC2533271.
57. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *The Journal of pathology*. 2005;207(2):139-46. doi: 10.1002/path.1829. PubMed PMID: 16088978.
58. Yamashita H, Nishio M, Kobayashi S, Ando Y, Sugiura H, Zhang Z, et al. Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2005;7(5):R753-64. doi: 10.1186/bcr1285. PubMed PMID: 16168121; PubMed Central PMCID: PMC1242143.
59. de Leeuw R, Neefjes J, Michalides R. A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. *International journal of breast cancer*. 2011;2011:232435. Epub

- 2012/02/02. doi: 10.4061/2011/232435. PubMed PMID: 22295213; PubMed Central PMCID: PMC3262574.
60. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS letters*. 2004;567(2-3):243-7. doi: 10.1016/j.febslet.2004.04.071. PubMed PMID: 15178330.
61. Stender JD, Nwachukwu JC, Kastrati I, Kim Y, Strid T, Yakir M, et al. Structural and Molecular Mechanisms of Cytokine-Mediated Endocrine Resistance in Human Breast Cancer Cells. *Molecular cell*. 2017;65(6):1122-35 e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.008. PubMed PMID: 28306507; PubMed Central PMCID: PMC5546241.
62. Fuqua SA. Estrogen receptor mutagenesis and hormone resistance. *Cancer*. 1994;74(3 Suppl):1026-9. PubMed PMID: 8039136.
63. Jiang SY, Langan-Fahey SM, Stella AL, McCague R, Jordan VC. Point mutation of estrogen receptor (ER) in the ligand-binding domain changes the pharmacology of antiestrogens in ER-negative breast cancer cells stably expressing complementary DNAs for ER. *Molecular endocrinology*. 1992;6(12):2167-74. doi: 10.1210/mend.6.12.1491696. PubMed PMID: 1491696.
64. Generali D, Buffa FM, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, et al. Phosphorylated ERalpha, HIF-1alpha, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(2):227-34. doi: 10.1200/JCO.2007.13.7083. PubMed PMID: 19064988.
65. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *The EMBO journal*. 1996;15(9):2174-83. PubMed PMID: PMC450141.
66. Orlando L, Schiavone P, Fedele P, Calvani N, Nacci A, Rizzo P, et al. Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer treatment reviews*. 2010;36 Suppl 3:S67-71. Epub 2010/12/07. doi: 10.1016/s0305-7372(10)70023-2. PubMed PMID: 21129614.
67. Cristofanilli M, Valero V, Mangalik A, Royce M, Rabinowitz I, Arena FP, et al. Phase II, randomized trial to compare anastrozole combined with gefitinib or placebo in postmenopausal women with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(6):1904-14. Epub 2010/03/11. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-09-2282. PubMed PMID: 20215537.
68. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(6):520-9. Epub 2011/12/14. doi: 10.1056/NEJMoa1109653. PubMed PMID: 22149876; PubMed Central PMCID: PMC35705195.
69. ClinicalTrials Database: NCT01560416. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01560416>.
70. ClinicalTrials Database:NCT01202591. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01202591>.
71. ClinicalTrials Database: NCT01633060. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01633060>.
72. ClinicalTrials Database: NCT02340221. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02340221>.
73. ClinicalTrials Database: NCT02107703. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02107703>.
74. ClinicalTrials Database: NCT02028507. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02028507>.
75. ClinicalTrials Database: NCT02115282. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02115282>.
76. ClinicalTrials Database: NCT01528345. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01528345>.

77. Cosconati S, Forli S, Perryman AL, Harris R, Goodsell DS, Olson AJ. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. Expert opinion on drug discovery. 2010;5(6):597-607. Epub 2011/05/03. doi: 10.1517/17460441.2010.484460. PubMed PMID: 21532931; PubMed Central PMCID: PMC3083070.
78. Tiziano T. Docking-Based Virtual Screening: Recent Developments. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2009;12(3):303-14. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/138620709787581666>.
79. Jacob RB, Andersen T, McDougal OM. Accessible high-throughput virtual screening molecular docking software for students and educators. PLoS computational biology. 2012;8(5):e1002499. Epub 2012/06/14. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002499. PubMed PMID: 22693435; PubMed Central PMCID: PMC3364939.
80. Leeson P. Drug discovery: Chemical beauty contest. Nature. 2012;481(7382):455-6. Epub 2012/01/28. doi: 10.1038/481455a. PubMed PMID: 22281594.
81. Menna PL, Skilton G, Leskow FC, Alonso DF, Gomez DE, Kazanietz MG. Inhibition of Aggressiveness of Metastatic Mouse Mammary Carcinoma Cells by the β 2-Chimaerin GAP Domain. Cancer research. 2003;63(9):2284-91.
82. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nature reviews Molecular cell biology. 2005;6(2):167-80. Epub 2005/02/03. doi: 10.1038/nrm1587. PubMed PMID: 15688002.
83. Price LS, Langeslag M, ten Klooster JP, Hordijk PL, Jalink K, Collard JG. Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. The Journal of biological chemistry. 2003;278(41):39413-21. Epub 2003/07/31. doi: 10.1074/jbc.M302083200. PubMed PMID: 12888567.
84. Qiu RG, Chen J, Kirn D, McCormick F, Symons M. An essential role for Rac in Ras transformation. Nature. 1995;374(6521):457-9. Epub 1995/03/30. doi: 10.1038/374457a0. PubMed PMID: 7700355.
85. Khosravi-Far R, Solski PA, Clark GJ, Kinch MS, Der CJ. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. Molecular and cellular biology. 1995;15(11):6443-53. Epub 1995/11/01. PubMed PMID: 7565796; PubMed Central PMCID: PMC30895.
86. Gao Y, Xing J, Streuli M, Leto TL, Zheng Y. Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. The Journal of biological chemistry. 2001;276(50):47530-41. Epub 2001/10/12. doi: 10.1074/jbc.M108865200. PubMed PMID: 11595749.
87. Worthylake DK, Rossman KL, Sondek J. Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. Nature. 2000;408(6813):682-8. Epub 2000/12/29. doi: 10.1038/35047014. PubMed PMID: 11130063.
88. Hernandez E, De La Mota-Peynado A, Dharmawardhane S, Vlaar CP. Novel inhibitors of Rac1 in metastatic breast cancer. Puerto Rico health sciences journal. 2010;29(4):348-56. Epub 2011/01/26. PubMed PMID: 21261173.
89. Fritz G, Kaina B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. Current cancer drug targets. 2006;6(1):1-14. Epub 2006/02/16. PubMed PMID: 16475973.
90. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. Journal of Chemical Information and Modeling. 2012;52(7):1757-68. doi: 10.1021/ci3001277. PubMed PMID: PMC3402020.
91. Cabrera M, Echeverria E, Lenicov FR, Cardama G, Gonzalez N, Davio C, et al. Pharmacological Rac1 inhibitors with selective apoptotic activity in human acute leukemic cell lines. Oncotarget. 2017;8(58):98509-23. Epub 2017/12/13. doi: 10.18632/oncotarget.21533. PubMed PMID: 29228706; PubMed Central PMCID: PMC5716746.
92. Cardama GA, Gonzalez N, Ciarlantini M, Gandolfi Donadio L, Comin MJ, Alonso DF, et al. Proapoptotic and antiinvasive activity of Rac1 small molecule inhibitors on malignant glioma cells. OncoTargets and therapy. 2014;7:2021-33. Epub 2014/11/08. doi: 10.2147/ott.s67998. PubMed

PMID: 25378937; PubMed Central PMCID: PMC4218912.

93. Cardama GA, Comin MJ, Hornos L, Gonzalez N, Defelipe L, Turjanski AG, et al. Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2014;14(6):840-51. Epub 2013/09/27. PubMed PMID: 24066799; PubMed Central PMCID: PMC4104455.
94. Cardama GA, Alonso DF, Gonzalez N, Maggio J, Gomez DE, Rolfo C, et al. Relevance of small GTPase Rac1 pathway in drug and radio-resistance mechanisms: opportunities in cancer therapeutics (Review). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2018. doi: en prensa.
95. Cai D, Iyer A, Felekis KN, Near RI, Luo Z, Chernoff J, et al. AND-34/BCAR3, a GDP exchange factor whose overexpression confers antiestrogen resistance, activates Rac, PAK1, and the cyclin D1 promoter. *Cancer research*. 2003;63(20):6802-8. Epub 2003/10/30. PubMed PMID: 14583477.
96. Rosenblatt AE, Garcia MI, Lyons L, Xie Y, Maiorino C, Désiré L, et al. Inhibition of the Rho GTPase, Rac1, decreases estrogen receptor levels and is a novel therapeutic strategy in breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2011;18(2):207-19. doi: 10.1677/erc-10-0049.
97. Tharakan R, Lepont P, Singleton D, Kumar R, Khan S. Phosphorylation of estrogen receptor alpha, serine residue 305 enhances activity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008;295(1-2):70-8. Epub 2008/08/30. doi: 10.1016/j.mce.2008.07.018. PubMed PMID: 18755239.
98. Rayala SK, Talukder AH, Balasenthil S, Tharakan R, Barnes CJ, Wang RA, et al. P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation. *Cancer research*. 2006;66(3):1694-701. Epub 2006/02/03. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-2922. PubMed PMID: 16452229.
99. Lange CA. Making Sense of Cross-Talk between Steroid Hormone Receptors and Intracellular Signaling Pathways: Who Will Have the Last Word? *Molecular endocrinology*. 2004;18(2):269-78. doi: 10.1210/me.2003-0331.
100. Lee K, Liu Y, Mo JQ, Zhang J, Dong Z, Lu S. Vav3 oncogene activates estrogen receptor and its overexpression may be involved in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:158. Epub 2008/06/04. doi: 10.1186/1471-2407-8-158. PubMed PMID: 18518979; PubMed Central PMCID: PMC2430719.
101. Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(2):101-12. Epub 2003/03/15. doi: 10.1038/nrc721. PubMed PMID: 12635173.
102. Holm C, Rayala S, Jirstrom K, Stal O, Kumar R, Landberg G. Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(10):671-80. Epub 2006/05/18. doi: 10.1093/jnci/djj185. PubMed PMID: 16705121.
103. Aguilar H, Urruticoechea A, Halonen P, Kiyotani K, Mushiroda T, Barril X, et al. VAV3 mediates resistance to breast cancer endocrine therapy. *Breast cancer research : BCR*. 2014;16(3):R53. Epub 2014/06/03. doi: 10.1186/bcr3664. PubMed PMID: 24886537; PubMed Central PMCID: PMC4076632.
104. Alonso DF, Farias EF, Urtreger A, Ladeda V, Vidal MC, Bal De Kier Joffe E. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *Journal of surgical oncology*. 1996;62(4):288-97. Epub 1996/08/01. doi: 10.1002/(sici)1096-9098(199608)62:4<288::aid-jso14>3.0.co;2-1. PubMed PMID: 8691844.
105. Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, et al. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*. 1994;77(4):537-49. Epub 1994/05/20. PubMed PMID: 7999144.
106. Stam JC, Sander EE, Michiels F, van Leeuwen FN, Kain HET, van der Kammen RA, et al. Targeting of Tiam1 to the Plasma Membrane Requires the Cooperative Function of the N-terminal Pleckstrin Homology Domain and an Adjacent Protein Interaction Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(45):28447-54. doi: 10.1074/jbc.272.45.28447.

107. Li Q, Birkbak NJ, Györfy B, Szallasi Z, Eklund AC. Jetset: selecting the optimal microarray probe set to represent a gene. *BMC bioinformatics*. 2011;12:474. Epub 2011/12/17. doi: 10.1186/1471-2105-12-474. PubMed PMID: 22172014; PubMed Central PMCID: PMC3266307.
108. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HK, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature communications*. 2016;7:11479. Epub 2016/05/11. doi: 10.1038/ncomms11479. PubMed PMID: 27161491; PubMed Central PMCID: PMC4866047.
109. Segatori VI, Otero LL, Fernandez LE, Gomez DE, Alonso DF, Gabri MR. Antitumor protection by NGcGM3/VSSP vaccine against transfected B16 mouse melanoma cells overexpressing N-glycosylated gangliosides. *In vivo (Athens, Greece)*. 2012;26(4):609-17. Epub 2012/07/10. PubMed PMID: 22773575.
110. Holden P, Horton WA. Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC Research Notes*. 2009;2(1):243. doi: 10.1186/1756-0500-2-243.
111. Chow S, Patel H, Hedley DW. Measurement of MAP kinase activation by flow cytometry using phospho-specific antibodies to MEK and ERK: potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors. *Cytometry*. 2001;46(2):72-8. Epub 2001/04/20. PubMed PMID: 11309815.
112. Rathinam R, Berrier A, Alahari SK. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2011;16:2561-71. Epub 2011/05/31. PubMed PMID: 21622195.
113. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology*. 2005;21:247-69. Epub 2005/10/11. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721. PubMed PMID: 16212495.
114. Porter AP, Papaioannou A, Malliri A. Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases*. 2016;7(3):123-38. doi: 10.1080/21541248.2016.1173767. PubMed PMID: 27104658; PubMed Central PMCID: PMC5003542.
115. Huelsenbeck SC, Schorr A, Roos WP, Huelsenbeck J, Henninger C, Kaina B, et al. Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(46):38590-9. Epub 2012/09/27. doi: 10.1074/jbc.M112.377903. PubMed PMID: 23012366; PubMed Central PMCID: PMC3493904.
116. Nohata N, Uchida Y, Stratman AN, Adams RH, Zheng Y, Weinstein BM, et al. Temporal-specific roles of Rac1 during vascular development and retinal angiogenesis. *Developmental biology*. 2016;411(2):183-94. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.02.005. PubMed PMID: 26872874.
117. Sylow L, Nielsen IL, Kleinert M, Moller LL, Ploug T, Schjerling P, et al. Rac1 governs exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle through regulation of GLUT4 translocation in mice. *The Journal of physiology*. 2016;594(17):4997-5008. Epub 2016/04/12. doi: 10.1113/jp272039. PubMed PMID: 27061726; PubMed Central PMCID: PMC45009787.
118. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012;150(2):251-63. Epub 2012/07/24. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.024. PubMed PMID: 22817889; PubMed Central PMCID: PMC3600117.
119. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchicchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics*. 2012;44(9):1006-14. Epub 2012/07/31. doi: 10.1038/ng.2359. PubMed PMID: 22842228; PubMed Central PMCID: PMC3432702.
120. Vu HL, Rosenbaum S, Purwin TJ, Davies MA, Aplin AE. RAC1 P29S regulates PD-L1 expression in melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2015;28(5):590-8. Epub 2015/07/16. doi: 10.1111/pcmr.12392. PubMed PMID: 26176707; PubMed Central PMCID: PMC4675336.
121. Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, Kandoth C, et al. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nature biotechnology*. 2016;34(2):155-63. Epub 2015/12/01. doi: 10.1038/nbt.3391. PubMed PMID: 26619011; PubMed Central PMCID: PMC4744099.

122. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European journal of cancer*. 2001;37 Suppl 4:S9-15. Epub 2001/10/13. PubMed PMID: 11597399.
123. Arai A, Jin A, Yan W, Mizuchi D, Yamamoto K, Nanki T, et al. SDF-1 synergistically enhances IL-3-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk signaling pathway through activation of Rac and its effector Pak kinases to promote hematopoiesis and chemotaxis. *Cellular signalling*. 2005;17(4):497-506. Epub 2004/12/17. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.09.007. PubMed PMID: 15601627.
124. Ellenbroek SI, Collard JG. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clinical & experimental metastasis*. 2007;24(8):657-72. Epub 2007/11/15. doi: 10.1007/s10585-007-9119-1. PubMed PMID: 18000759.
125. Bid HK, Roberts RD, Manchanda PK, Houghton PJ. RAC1: an emerging therapeutic option for targeting cancer angiogenesis and metastasis. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(10):1925-34. Epub 2013/09/28. doi: 10.1158/1535-7163.mct-13-0164. PubMed PMID: 24072884; PubMed Central PMCID: PMC3823055.
126. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 139(5):871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
127. Orgaz JL, Herraiz C, Sanz-Moreno V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases*. 2014;5:e29019. Epub 2014/07/19. doi: 10.4161/sgtp.29019. PubMed PMID: 25036871; PubMed Central PMCID: PMC384125382.
128. Yoon C, Cho SJ, Chang KK, Park DJ, Ryeom SW, Yoon SS. Role of Rac1 Pathway in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem-like Cell Phenotypes in Gastric Adenocarcinoma. *Molecular cancer research : MCR*. 2017;15(8):1106-16. Epub 2017/05/04. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-17-0053. PubMed PMID: 28461325; PubMed Central PMCID: PMC5540756.
129. Wu CY, Carpenter ES, Takeuchi KK, Halbrook CJ, Peverley LV, Bien H, et al. PI3K regulation of RAC1 is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1405-16 e7. Epub 2014/10/15. doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.032. PubMed PMID: 25311989; PubMed Central PMCID: PMC384252806.
130. Kissil JL, Walmsley MJ, Hanlon L, Haigis KM, Bender Kim CF, Sweet-Cordero A, et al. Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer research*. 2007;67(17):8089-94. Epub 2007/09/07. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-2300. PubMed PMID: 17804720.
131. Wang Z, Pedersen E, Basse A, Lefever T, Peyrollier K, Kapoor S, et al. Rac1 is crucial for Ras-dependent skin tumor formation by controlling Pak1-Mek-Erk hyperactivation and hyperproliferation in vivo. *Oncogene*. 2010;29(23):3362-73. Epub 2010/04/13. doi: 10.1038/onc.2010.95. PubMed PMID: 20383193.
132. Malliri A, van der Kammen RA, Clark K, van der Valk M, Michiels F, Collard JG. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature*. 2002;417(6891):867-71. Epub 2002/06/21. doi: 10.1038/nature00848. PubMed PMID: 12075356.
133. Lindsay CR, Lawn S, Campbell AD, Faller WJ, Rambow F, Mort RL, et al. P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nature communications*. 2011;2:555-. doi: 10.1038/ncomms1560. PubMed PMID: PMC3400057.
134. Sosa MS, Lopez-Haber C, Yang C, Wang H, Lemmon MA, Busillo JM, et al. Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Molecular cell*. 2010;40(6):877-92. Epub 2010/12/22. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.029. PubMed PMID: 21172654; PubMed Central PMCID: PMC3038344.
135. Kazanietz MG, Caloca MJ. The Rac GTPase in Cancer: From Old Concepts to New Paradigms. *Cancer research*. 2017;77(20):5445-51. Epub 2017/08/16. doi: 10.1158/0008-5472.can-17-1456. PubMed PMID: 28807941; PubMed Central PMCID: PMC5645227.
136. Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor-kappaB and C/EBP transcription factors. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(13):8506-15. Epub 1999/03/20. PubMed PMID: 10085083.
137. Hakoshima T, Shimizu T, Maesaki R. Structural basis of the Rho GTPase signaling. *Journal of*

- biochemistry. 2003;134(3):327-31. Epub 2003/10/17. PubMed PMID: 14561717.
138. Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(4):1942-52. PubMed PMID: PMC230420.
139. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992;70(3):401-10. Epub 1992/08/07. PubMed PMID: 1643658.
140. Wertheimer E, Gutierrez-Uzquiza A, Rosembli C, Lopez-Haber C, Sosa MS, Kazanietz MG. Rac signaling in breast cancer: a tale of GEFs and GAPs. *Cellular signalling*. 2012;24(2):353-62. Epub 2011/09/07. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.08.011. PubMed PMID: 21893191; PubMed Central PMCID: PMC3312797.
141. Jarzynka MJ, Hu B, Hui KM, Bar-Joseph I, Gu W, Hirose T, et al. ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion. *Cancer research*. 2007;67(15):7203-11. Epub 2007/08/03. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-0473. PubMed PMID: 17671188; PubMed Central PMCID: PMC2867339.
142. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature reviews Cancer*. 2010;10(12):842-57. Epub 2010/11/26. doi: 10.1038/nrc2960. PubMed PMID: 21102635; PubMed Central PMCID: PMC3124093.
143. Fields AP, Justilien V. The guanine nucleotide exchange factor (GEF) Ect2 is an oncogene in human cancer. *Advances in enzyme regulation*. 2010;50(1):190-200. doi: 10.1016/j.advenzreg.2009.10.010. PubMed PMID: PMC2863999.
144. Yang C, Liu Y, Leskow FC, Weaver VM, Kazanietz MG. Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by β 2-chimerin. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(26):24363-70. Epub 2005/05/03. doi: 10.1074/jbc.M411629200. PubMed PMID: 15863513.
145. Cáncer INd. 2016. Available from: <http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/mortalidad/>.
146. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(10):3797-803. doi: 10.1172/JCI57152.
147. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(16):1659-72. doi: 10.1056/NEJMoa052306. PubMed PMID: 16236737.
148. Sestak I, Cuzick J, Dowsett M, Lopez-Knowles E, Filipits M, Dubsy P, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(8):916-22. doi: 10.1200/jco.2014.55.6894. PubMed PMID: 25332252.
149. Caan BJ, Sweeney C, Habel LA, Kwan ML, Kroenke CH, Weltzien EK, et al. Intrinsic subtypes from the PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer survivor cohort: prognostication of short- and long-term outcomes. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2014;23(5):725-34. Epub 2014/02/14. doi: 10.1158/1055-9965.epi-13-1017. PubMed PMID: 24521998; PubMed Central PMCID: PMC34105204.
150. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(22):2783-90. Epub 2013/07/03. doi: 10.1200/jco.2012.46.1558. PubMed PMID: 23816962.
151. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of clinical*

- oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2017;35(24):2838-47. Epub 2017/07/12. doi: 10.1200/jco.2017.74.0472. PubMed PMID: 28692382.
152. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(25):1999-2009. doi: 10.1056/NEJMoa021967. PubMed PMID: 12490681.
153. Administration USFaD. Available from: <https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/LaboratoryDevelopedTests/default.htm>.
154. Atlas TCG. Available from: <https://cancergenome.nih.gov/>.
155. Rugo HS, Rumble RB, Macrae E, Barton DL, Connolly HK, Dickler MN, et al. Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(25):3069-103. doi: 10.1200/jco.2016.67.1487. PubMed PMID: 27217461.
156. Adam L, Vadlamudi RK, McCreagh P, Kumar R. Tiam1 Overexpression Potentiates Heregulin-induced Lymphoid Enhancer Factor-1/ β -Catenin Nuclear Signaling in Breast Cancer Cells by Modulating the Intercellular Stability. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(30):28443-50. doi: 10.1074/jbc.M009769200.
157. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research : BCR*. 2011;13(4):215. Epub 2011/09/03. doi: 10.1186/bcr2889. PubMed PMID: 21884641; PubMed Central PMCID: PMC3236329.
158. Piccart-Gebhart MJ. New developments in hormone receptor-positive disease. *The oncologist*. 2010;15 Suppl 5:18-28. Epub 2010/12/16. doi: 10.1634/theoncologist.2010-S5-18. PubMed PMID: 21138952.
159. Ellis AJ, Hendrick VM, Williams R, Komm BS. Selective estrogen receptor modulators in clinical practice: a safety overview. *Expert opinion on drug safety*. 2015;14(6):921-34. Epub 2015/05/06. doi: 10.1517/14740338.2015.1014799. PubMed PMID: 25936229.
160. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews*. 2007;87(3):905-31. Epub 2007/07/07. doi: 10.1152/physrev.00026.2006. PubMed PMID: 17615392.
161. Morrison G, Fu X, Shea M, Nanda S, Giuliano M, Wang T, et al. Therapeutic potential of the dual EGFR/HER2 inhibitor AZD8931 in circumventing endocrine resistance. *Breast cancer research and treatment*. 2014;144(2):263-72. Epub 2014/02/21. doi: 10.1007/s10549-014-2878-x. PubMed PMID: 24554387; PubMed Central PMCID: PMC4030601.
162. Bachelot T, Bourcier C, Cropet C, Ray-Coquard I, Ferrero JM, Freyer G, et al. Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(22):2718-24. Epub 2012/05/09. doi: 10.1200/jco.2011.39.0708. PubMed PMID: 22565002.
163. Beaver JA, Park BH. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Future oncology*. 2012;8(6):651-7. Epub 2012/07/07. doi: 10.2217/fon.12.49. PubMed PMID: 22764762; PubMed Central PMCID: PMC3466807.
164. Marei H, Malliri A. Rac1 in human diseases: The therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms. *Small GTPases*. 2017;8(3):139-63. doi: 10.1080/21541248.2016.1211398.
165. Chan CM, Martin LA, Johnston SR, Ali S, Dowsett M. Molecular changes associated with the acquisition of oestrogen hypersensitivity in MCF-7 breast cancer cells on long-term oestrogen deprivation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2002;81(4-5):333-41. Epub 2002/10/04. PubMed PMID: 12361723.
166. Stephen RL, Shaw LE, Larsen C, Corcoran D, Darbre PD. Insulin-like growth factor receptor

levels are regulated by cell density and by long term estrogen deprivation in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(43):40080-6. Epub 2001/07/18. doi: 10.1074/jbc.M105892200. PubMed PMID: 11457860.

167. Jeng MH, Shupnik MA, Bender TP, Westin EH, Bandyopadhyay D, Kumar R, et al. Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology*. 1998;139(10):4164-74. Epub 1998/09/29. doi: 10.1210/endo.139.10.6229. PubMed PMID: 9751496.

168. Masamura S, Santner SJ, Heitjan DF, Santen RJ. Estrogen deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995;80(10):2918-25. Epub 1995/10/01. doi: 10.1210/jcem.80.10.7559875. PubMed PMID: 7559875.

169. Welshons WV, Jordan VC. Adaptation of estrogen-dependent MCF-7 cells to low estrogen (phenol red-free) culture. *European journal of cancer & clinical oncology*. 1987;23(12):1935-9. Epub 1987/12/01. PubMed PMID: 3436356.

170. Katzenellenbogen BS, Kendra KL, Norman MJ, Berthois Y. Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. *Cancer research*. 1987;47(16):4355-60. Epub 1987/08/15. PubMed PMID: 3607768.

171. Hayes EL, Lewis-Wambi JS. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA. *Breast cancer research : BCR*. 2015;17:40. doi: 10.1186/s13058-015-0542-y. PubMed PMID: PMC4362832.

172. Mester J, Redeuilh G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2008;8(8):872-85. Epub 2008/12/17. PubMed PMID: 19075570.

173. Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, Pritchard KI, Lebrun F, Ito Y, et al. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2 dagger. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014;25(12):2357-62. Epub 2014/09/19. doi: 10.1093/annonc/mdu456. PubMed PMID: 25231953.

174. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*. 2007;26(13):1932-40. Epub 2006/09/27. doi: 10.1038/sj.onc.1209990. PubMed PMID: 17001314.

175. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research*. 2006;66(3):1500-8. Epub 2006/02/03. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-2925. PubMed PMID: 16452206; PubMed Central PMCID: PMC3193604.

176. Maurer C, Martel S, Zardavas D, Ignatiadis M. New agents for endocrine resistance in breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2017;34:1-11. Epub 2017/04/28. doi: 10.1016/j.breast.2017.04.007. PubMed PMID: 28448864.

177. Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science (New York, NY)*. 1995;269(5228):1270-2. Epub 1995/09/01. PubMed PMID: 7652575.

178. Lamarche N, Tapon N, Stowers L, Burbelo PD, Aspenstrom P, Bridges T, et al. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell*. 1996;87(3):519-29. Epub 1996/11/01. PubMed PMID: 8898204.

179. Mettouchi A, Klein S, Guo W, Lopez-Lago M, Lemichez E, Westwick JK, et al. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Molecular cell*. 2001;8(1):115-27. Epub 2001/08/21. PubMed PMID: 11511365.

180. Yoshida T, Zhang Y, Rivera Rosado LA, Chen J, Khan T, Moon SY, et al. Blockade of Rac1 activity induces G1 cell cycle arrest or apoptosis in breast cancer cells through downregulation of cyclin D1, survivin, and X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Molecular cancer therapeutics*.

- 2010;9(6):1657-68. Epub 2010/06/03. doi: 10.1158/1535-7163.mct-09-0906. PubMed PMID: 20515940.
181. Clarke R, Brünner N, Katzenellenbogen BS, Thompson EW, Norman MJ, Koppi C, et al. Progression of human breast cancer cells from hormone-dependent to hormone-independent growth both in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(10):3649-53. PubMed PMID: PMC287195.
182. Rayala SK, Molli PR, Kumar R. Nuclear p21-activated kinase 1 in breast cancer packs off tamoxifen sensitivity. *Cancer research*. 2006;66(12):5985-8. Epub 2006/06/17. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-0978. PubMed PMID: 16778166.
183. Oladimeji P, Diakonova M. PAK1 translocates into nucleus in response to prolactin but not to estrogen. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;473(1):206-11. Epub 2016/03/24. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.079. PubMed PMID: 27003261; PubMed Central PMCID: PMC4836979.
184. Bostner J, Ahnstrom Waltersson M, Fornander T, Skoog L, Nordenskjold B, Stal O. Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer. *Oncogene*. 2007;26(49):6997-7005. Epub 2007/05/09. doi: 10.1038/sj.onc.1210506. PubMed PMID: 17486065.
185. Ghosh A, Awasthi S, Peterson JR, Hamburger AW. Regulation of tamoxifen sensitivity by a PAK1-EBP1 signalling pathway in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2013;108(3):557-63. doi: 10.1038/bjc.2013.11. PubMed PMID: PMC3593557.
186. Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R. P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor- α and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *The EMBO journal*. 2002;21(20):5437-47. doi: 10.1093/emboj/cdf543.
187. Murphy LC, Seekallu SV, Watson PH. Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation. *Endocrine-related cancer*. 2011;18(1):R1-14. Epub 2010/12/15. doi: 10.1677/erc-10-0070. PubMed PMID: 21149515.
188. Zhuang T, Zhu J, Li Z, Lorent J, Zhao C, Dahlman-Wright K, et al. p21-activated kinase group II small compound inhibitor GNE-2861 perturbs estrogen receptor alpha signaling and restores tamoxifen-sensitivity in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(41):43853-68. Epub 2015/11/12. doi: 10.18632/oncotarget.6081. PubMed PMID: 26554417; PubMed Central PMCID: PMC4791272.
189. Yang Y, Yang HH, Hu Y, Watson PH, Liu H, Geiger TR, et al. Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. *Oncotarget*. 2017;8(19):30621-43. Epub 2017/04/22. doi: 10.18632/oncotarget.15695. PubMed PMID: 28430642; PubMed Central PMCID: PMC458155.



Laboratorio de Oncología Molecular
Departamento de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes



Laboratorio
de Oncología Molecular

CONICET



Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas

