



Cardama, Georgina A.

Desarrollo de nuevos inhibidores de Rho GTPasas con actividad antitumoral mediante un screening virtual basado en docking



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:

Cardama, G. A. (2014). Desarrollo de nuevos inhibidores de Rho GTPasas con actividad antitumoral mediante un screening virtual basado en docking (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/20.500.11807/2036

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



Georgina A. Cardama, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Junio de 2014, pp. 182, http://ridaa.unq.edu.ar, Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado, Doctorado en Ciencia y Tecnología

Desarrollo de nuevos inhibidores de Rho GTPasas con actividad antitumoral mediante un *screening* virtual basado en *docking*

TESIS DOCTORAL

Georgina A. Cardama

gcardama@gmail.com

Resumen

La vía de señalización de las Rho GTPasas cumple un rol fundamental en la regulación de múltiples procesos celulares. La activación aberrante de Rac1, un miembro de la familia de las Rho GTPasas, está asociado con tumorigénesis, progresión tumoral y metástasis en diferentes tipos tumorales. Particularmente, la vía de Rac1 se encuentra sobreexpresada e hiperactivada en diferentes tipos de cáncer, incluyendo al carcinoma mamario agresivo y al glioblastoma. Es por esto que la vía de Rac1 es considerada como un blanco molecular interesante.

Tomando como punto de partida la estructura tridimensional de la proteína Rac1 y un subset de 250.000 estructuras tridimensionales de compuestos tipo droga de la base de datos libre ZINC, se llevó adelante un *screening* virtual basado en *docking*. A partir de dicho experimento *in silico*, se identificaron una serie de compuestos que posiblemente presentaban afinidad por el sitio de interacción de Rac1 con sus activadores tipo GEF. Se seleccionaron 11 compuestos del *screening in silico* y se evaluaron *in vitro*, identificando al Hit1 (ZINC69391) como el candidato más interesante para posterior desarrollo.

En primer lugar, se evaluó el compuesto en modelos de carcinoma mamarios agresivos. Se observó que ZINC69391 fue capaz de inhibir la interacción de Rac1 con su activador tipo GEF Tiam1, llevando a la inhibición de la activación de Rac1 mediada por EGF, uno de los factores de crecimiento que activan esta vía de señalización, sin interferir con la activación de la GTPasa íntimamente relacionada Cdc42. Se observó que ZINC69391 fue capaz de inhibir la proliferación, la migración celular y arrestar el ciclo celular en fase G1 de células de carcinoma mamario agresivas. Además, ZINC69391 mostró tener efecto antimetastásico *in vivo* en un modelo murino singénico.

Con el objetivo de optimizar el compuesto, a partir de ZINC69391 se diseñaron racionalmente y se sintetizaron una serie de análogos. Se identificó a un análogo más activo denominado 1A-116. El compuesto 1A-116 fue capaz de inhibir la interacción de Rac1 con P-Rex1, un GEF clave para la progresión de tumores mamarios, y logró inhibir la activación de Rac1 a concentraciones menores que el compuesto parental sin afectar la activación de Cdc42 en el modelo de carcinoma mamario. Mostró una mayor actividad antitumoral y antimetastásica *in vivo* en un modelo murino singénico.

Por otro lado, también se evaluó el compuesto ZINC69391 en células de glioblastoma, mostrando que es capaz de interferir la interacción de Rac1 con otro GEF específico relacionado directamente con la agresividad de glioblastomas en pacientes, denominado Dock180. ZINC69391 inhibió la activación de Rac1 en respuesta a EGF en células de glioblastoma humano y también la fosforilación de Pak1, un efector importante de Rac1. ZINC69391 mostró inhibir la proliferación celular, arrestar el ciclo celular en fase G1 y gatillar un efecto proapoptótico. ZINC69391 bloqueó la migración e invasión celular a través de la modulación del citoesqueleto de actina, eventos claves para la patogénesis de este tipo tumoral. En un modelo intracraneal xenogénico murino el tratamiento diario con 20 mg/kg/dia de ZINC69391 vía i.p logró un aumento significativo en la sobrevida de los animales en comparación con el grupo control. También evaluamos el efecto del análogo 1A-116 en células de glioblastoma humano y fue más potente que el compuesto parental, presentando una mayor actividad antiproliferativa y antiinvasiva.

Estos nuevos inhibidores de Rac1 desarrollados son capaces de modular diferentes eventos celulares mediados por esta GTPasa y podrían ser utilizados como una estrategia novedosa para el tratamiento de tumores en los cuales Rac1 cumple un rol importante. Los compuestos muestran una gran potencialidad de aplicación en la clínica para el manejo terapéutico de diferentes tipos tumorales, tales como el carcinoma mamario agresivo y el glioblastoma.

Tesis de Doctorado

Autor

Georgina A. Cardama

Director: Dr. Daniel F. Alonso

Co-director: Dr. Pablo Lorenzano Menna

"Desarrollo de nuevos inhibidores de Rho GTPasas con actividad antitumoral mediante un *screening* virtual basado en *docking*"

Laboratorio de Oncología Molecular

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

-Año 2014-

Los resultados de esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- Cardama GA, Gonzalez N, Ciarlantini M, Gandolfi Donadío L, Comin MJ, Alonso DF, Lorenzano Menna P, Gomez DE. Proapoptotic and antiinvasive activity of Rac1 small molecule inhibitors on malignant glioma cells (enviado a Oncotargets and Therapy mayo 2014)
- Cardama GA, Comin MJ, Hornos L, Gonzalez N, Defelipe L, Turjanski AG, Alonso DF, Gomez DE, Menna LP. *Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines*. Anticancer Agents Med Chem. 2013 Sep 19. [Epub ahead of print]
- Lorenzano Menna P, <u>Cardama GA</u>, Comin MJ, Alonso DF, Gómez DE. *Rho GTPasas como blancos terapéuticos relevantes en cáncer y otras patologías humanas*. Medicina (B Aires). 2010;70(6):555-64

Los resultados de esta tesis dieron lugar a las siguientes presentaciones a congreso:

Congresos internacionales:

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, Noviembre de 2013, Campos do Jordão, Brasil

- 2013: "Novel Rac1-GEF inhibitors as anticancer agents for aggressive tumors" Cardama GA, Gonzalez N, Comin MJ, Turjanski AG, Alonso DF, Gomez DE, Lorenzano Menna P. Proceedings Suplement of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Poster Section 45. LB-305 (p. 101).
 Presentación Póster
- 2012: "Development of novel small molecules targeting Rac1-GEF signaling in highly aggressive breast cancer". Cardama GA, Comin MJ, Hornos L, Gonzalez N, Defelipe, Turjanski AG, Alonso DF, Gomez DE, Lorenzano Menna P. SISTAM 2012 (Spring Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine) Bariloche, Argentina, 4 al 9 de Noviembre. Póster, trabajo seleccionado para presentación oral.
- 2012: "Preclinical study of novel Rac1 inhibitor as therapeutic agents in glioblastoma multiforme". Cardama, G, Lorenzano Menna P, Comin J, Alonso DF and Gomez DE. The 1st Multidisciplinary Symposium "Molecular Oncology: from Laboratory Bench to Medicine" September 2012, Kiev, Ucrania. Póster
- 2011: "Strategy to develop novel anti-Rho GTPase compounds with antitumoral activity" Cardama, Georgina; Lorenzano Menna, Pablo; Alonso, Daniel; Gomez, Daniel. A.C Camargo Global Meeting of Translational Science, 2nd Sao Paulo School School of Translational Science. Molecular Medicine: from bench to bedside. Sao Paulo-SP, Brasil 19-24 June. Presentación de Póster
- 2010:"Strategies to develop novel anti Rho-GTPase compounds with antitumoral activity". Cardama, Georgina; Lorenzano Menna, Pablo; Alonso, Daniel; Gomez, Daniel. SISTAM 2010 (The First South American Spring Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine). Córdoba, Argentina, 24-28 October. Póster, trabajo seleccionado para Presentación Oral.

Congresos nacionales:

- 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 Investigaciones Clínicas (Congreso). 20 al 23 de Noviembre, Mar del Plata, Buenos Aires.
- 2013: "Propiedades anti-metastasicas 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 Investigaciones Clínicas. 20 al 23 de Noviembre, Mar del Plata, Buenos Aires.
- 2013: "Diseño y síntesis de moléculas pequeñas. Desarrollo de agentes antitumorales" Comin, M.J.; Garcia, C.L.; Ciarlantini, M.; Gandolfi Donadío, 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
- 2012: "Desarrollo preclínico inhibidores de Rac1 utilizando estrategias de diseño racional para el tratamiento de carcinoma mamario agresivo". Cardama, G; Comin, M; Hornos, L; González, N; Turjanski, A; Alonso, D; Gomez, D; Lorenzano Menna, P. 57° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (congreso). Del 14 al 17 de Noviembre, Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires.
- 2011: "Diseño y síntesis de guanidinas disustituídas. Moduladores de las vías de señalización celular asociadas a la trasformación maligna" Leandro Hornos, Georgina A. Cardama, Daniel F. Alonso, Daniel E. Gomez, Pablo Lorenzano

Menna, María J. Comin. XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica (XVIII SINAQO), Villa Carlos Paz, del 13 al 16 de noviembre

- 2011: "Estudio preclínico de nuevos compuestos inhibidores de la GTPasa Rac1 como agentes para el tratamiento de glioblastoma multiforme" Cardama GA;
 Gonzalez N; Comin MJ; Hornos L; Alonso DF; Gomez DE; Lorenzano Menna P.
 56° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (congreso).
 Del 16 al 19 de Noviembre, Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires.
- 2010: "Identificación de nuevos compuestos con actividad antitumoral capaces de interferir vías de señalización celular asociadas a la transformación maligna" Cardama, GA.; Comin MJ; Alonso, Daniel F.; Gómez, Daniel G.; Lorenzano Menna, Pablo. 55° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (congreso). Del 17 al 20 de Noviembre, Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Índice

ABREVIATURAS	13
OBJETIVOS	17
INTRODUCCIÓN	21
DESARROLLO DE DROGAS EN CÁNCER: UNA PERSPECTIVA HISTÓRICA	23
DESARROLLO DE DROGAS UTILIZANDO ESTRATEGIAS DIRIGIDAS A UN BLANCO ESPECÍFICO	24
Selección y validación del blanco	26
Generación de Hits y compuestos líderes	33
OPTIMIZACIÓN DEL LÍDER Y ENSAYOS PRECLÍNICOS	39
Ensayos clínicos de drogas dirigidas: cambio de paradigma	40
CÁNCER	43
CARCINOMA MAMARIO	44
Metástasis	46
Terapéutica actual del cáncer mamario	49
GLIOMAS	50
PATOGÉNESIS MOLECULAR	53
Terapéutica actual de glioblastomas de alto grado	54
RHO GTPASAS	57
FUNCIONES MEDIADAS POR LA GTPASA RAC1	60
RHO GEFS	62
Rac1 y GEFs en cáncer	64
RHO GTPASAS COMO BLANCOS MOLECULARES	67
MATERIALES Y MÉTODOS	71
ENSAYOS IN SILICO	73
ENSAYOS IN VITRO	73
ENSAYOS IN VIVO	83
RESULTADOS	87
CAPÍTULO I	89

BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES ANTITUMORALES UTILIZANDO UNA ESTRATEGIA DE SCREENING VIRTUAL BAS	ADO
EN DOCKING	91
Selección y validación del blanco	91
Generación de Hits: Screening virtual basado en docking	92
Screening in vitro de posibles inhibidores de Rac1	95
Selección del Hit1(ZINC69391) como inhibidor de la activación de Rac1	96
Estudios in silico de interacción del Hit1(ZINC69391) y Rac1	97
CONCLUSIONES – CAPÍTULO I	99
CAPÍTULO II	101
DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES DE RAC1 EN MODELOS DE CÁNCER MAMARIO AGRESIVO	103
Determinación del efecto de ZINC69391 sobre la interacción de Rac1-Tiam1	104
Efecto de ZINC69391 sobre los niveles de activación de Rac1 y evaluación de su especificidad i	n
vitro	106
Efecto de ZINC69391 sobre la proliferación celular in vitro sobre líneas de carcinoma mamario	107
Efecto de ZINC69391 sobre la progresión del ciclo celular sobre células de carcinoma mamario	
humano	109
Determinación del efecto de ZINC69391 sobre la migración celular y la dinámica del citoesque	leto
de actina	109
Estudio de la toxicidad de ZINC69391 in vivo	112
Efecto de ZINC69391 sobre la diseminación metastásica in vivo en un modelo murino singénic	o de
metástasis experimental	112
Diseño racional de análogos de ZINC69391	114
Efecto antiproliferativo de 1A-116 mediante un mecanismo basado en Rac1	118
Efecto de 1A-116 sobre la interacción P-Rex1-Rac1 y los niveles de activación de Rac1	119
Estudio de la toxicidad del análogo 1A-116 in vivo	121
Efecto antimetastásico del análogo 1A-116	122
Efecto antitumoral in vivo de ZINC69391 vs. 1A-116	123
CONCLUSIONES - CAPÍTULO II	125
CAPÍTULO III	127
DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES DE RAC1 EN UN MODELO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO	129
Determinación del efecto de ZINC69391 sobre la interacción de Rac1 - Dock-180	130
Evaluación del efecto de ZINC69391 sobre la activación de Rac1 y su efector Pak1	132
Efecto de ZINC69391 sobre la proliferación celular y la progresión del ciclo celular en líneas de	
glioma humano	133
Evaluación del efecto de ZINC69391 sobre la apoptosis de células de glioma humano	135
Efecto de ZINC69391 sobre migración e invasión de células de glioma	136

Evaluación del efecto in vivo de ZINC69391 en un modelo murino xenogenico ortotopico de	
glioblastoma	139
El análogo 1A-116 presenta un efecto antiproliferativo y antiinvasivo más potente que el	
compuesto parental	140
CONCLUSIONES – CAPÍTULO III	142
DISCUSIÓN	143
DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES DE RAC1 EN MODELOS DE CÁNCER MAMARIO AGRESIVO	145
DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES DE RAC1 EN UN MODELO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO	155
AGRADECIMIENTOS	163
BIBLIOGRAFÍA	169

Abreviaturas

ARNi - ARN de interferencia
Da - Daltons
EGF - Factor de crecimiento epidérmico
EGFR - Receptor de EGF
EGFR - Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER - Receptor de estrógeno
FDA - Food and Drug administration (Agencia Regulatoria de Alimentos y Drogas de EE.UU)
GAP- Proteína activadora de GTPasa
GBM - Glioblastoma Multiforme
GEF - Factores intercambiadores de guanina
GDP- Guanosina Difosfato
GTP - Guanosina Trifosfato
HER2 - Receptor de EGF tipo 2
HTS - High Throughput Screening (screening de alto rendimiento)
IHQ - Inmunohistoquímica
i.p - intra peritoneal
PBS - Buffer fosfato salino
PDGF - Factor de Crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR - Receptor de PDGF
PR - Receptor de progesterona
SFB - Suero Fetal Bovino
SNC - Sistema nervioso central

VEGF - Factor de crecimiento del endotelio vascular

Objetivo general

Desarrollar nuevos inhibidores de la GTPasa Rac1 a partir de un *screening virtual* basado en *docking* y evaluar su posible efecto antitumoral en diferentes modelos, centrándose en un modelo de carcinoma mamario y de glioblastoma humano.

Objetivos específicos

- Llevar a cabo un *screening in silico* con el fin de encontrar moléculas capaces de interferir la interacción de Rac1 con sus activadores tipo GEF.
- Estudiar el efecto antitumoral in vitro de los compuestos identificados sobre líneas tumorales humanas donde la sobreexpresión de Rac1 es importante para el establecimiento del fenotipo transformado. En particular, sobre líneas celulares de carcinoma mamario humano y de glioblastoma humano.
- Estudiar el efecto de los compuestos sobre la interacción de Rac1 con sus activadores tipo GEF.
- Estudiar el efecto de los compuestos líderes identificados sobre la vía de señalización de la GTPasa Rac1.
- Evaluar el efecto de los compuestos sobre eventos celulares mediados por Rac1 implicados en la biología tumoral como migración celular, reorganización del citoesqueleto de actina, apoptosis y regulación del ciclo celular.
- Evaluar el efecto antitumoral *in vivo* de los compuestos identificados.
- Evaluar la actividad de nuevos análogos desarrollados a partir de los compuestos seleccionados en el screening virtual.

Desarrollo de drogas en cáncer: una perspectiva histórica

El término "quimioterapia" fue definido por el químico alemán Paul Ehrlich como la utilización de drogas para el tratamiento de enfermedades [1]. Particularmente, la quimioterapia para el tratamiento del cáncer comenzó a desarrollarse a comienzos del siglo XX y el hallazgo de estos agentes antitumorales fue accidental en el comienzo. Luego, el desarrollo de drogas quimioterapéuticas se basó en estrategias empíricas. Si bien esta estrategia de búsqueda de drogas, basada en el la pesquisa al azar de diferentes compuestos, alcanzó un éxito significativo y es la base de la terapéutica del cáncer actual, el desarrollo de drogas en cáncer ha sufrido un cambio de paradigma en la última etapa del siglo XX hasta la actualidad.

El cáncer era entendido como una enfermedad que tenía como característica principal una división celular descontrolada. Por ello, todos los esfuerzos en el desarrollo de nuevas terapias estaban dirigidos a compuestos citotóxicos con capacidad antiproliferativa que afectaran al ADN. Sin embargo, con el desarrollo de la biología molecular se comenzó a visualizar la complejidad de la enfermedad y que la división descontrolada es solo un aspecto del fenotipo transformado [2]. Con el tiempo, la quimioterapia ha hecho una transición a la era de las "terapias dirigidas", reemplazando el *screening* al azar por *screening* contra blancos moleculares críticos y específicos, siguiendo una estrategia más racional y mecanística. Estos agentes dirigidos a blancos moleculares específicos, son compuestos pre-diseñados para inhibir y/o modificar un elemento relevante en la progresión del tumor. Estos compuestos, resultaron ser pequeñas moléculas de origen natural o sintético o bien, anticuerpos monoclonales.

El primero y mejor ejemplo de terapias dirigidas es el desarrollo del inhibidor de la tirosina-quinasa Bcr-Abl, denominado imatinib mesilato (Gleevec®, Novartis) para el tratamiento de leucemia mielocítica crónica (LMC), la cual se caracteriza por presentar la traslocación cromosómica conocida como cromosoma Filadelfia y fue aprobado en el año 2001 por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU para el tratamiento de LMC. Este tratamiento mostró una respuesta muy favorable como único agente en LMCs que presentan la traslocación y es menos tóxico que la quimioterapia convencional. Particularmente, el éxito de esta terapia se basa en una aberración cromosómica definida, la cual trae aparejada la presencia de una quinasa mutada solo presente en el fenotipo transformado. Si bien la patogénesis molecular de la mayoría de los tumores sólidos no se encuentra asociada a un único defecto genético o blanco, este ejemplo muestra una prueba de concepto importante para el desarrollo de terapias con blancos moleculares específicos.

Desarrollo de drogas utilizando estrategias dirigidas a un blanco específico

El objetivo principal de las terapias dirigidas es mejorar la eficacia y la selectividad del tratamiento contra el cáncer al bloquear específicamente los mecanismos patogénicos relevantes en la transformación maligna. Al contrario de lo que sucede con las drogas citotóxicas, las drogas dirigidas están pensadas para modular alguno de los procesos claves de la biología tumoral, como por ejemplo la migración, invasión, apoptosis, angiogénesis, la evasión inmunológica, entre otros. En este contexto, las terapias dirigidas prometen ser más selectivas y menos tóxicas en los tejidos sanos [3].

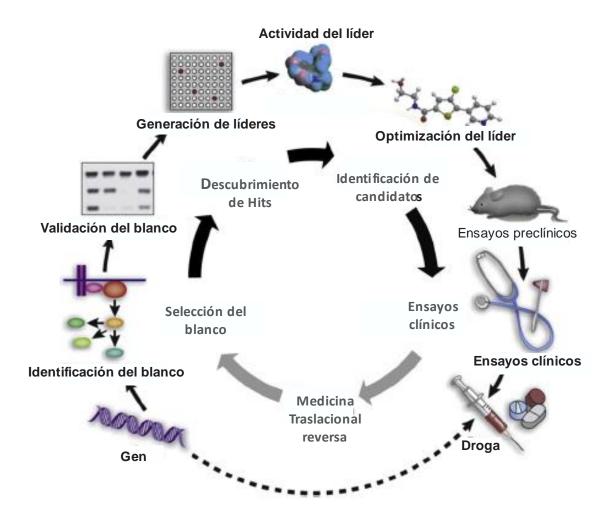


Figura 1|**Desarrollo de drogas: del gen a la terapia.** Etapas de un proyecto de desarrollo de drogas. "La medicina traslacional reversa" se refiere al diálogo de la clínica y el laboratorio durante el proceso de aprobación de la droga e incluso posteriormente. Modificado de Hoelder *et al*, 2012

El diseño y desarrollo de nuevas drogas es un proceso complejo, largo y caro. La duración promedio de este tipo de proyectos en las industrias farmacéuticas es de aproximadamente 13-15 años desde el momento en que se

origina el proyecto hasta que está en el mercado: considerando 4-5 años de evaluación preclínica y alrededor de 9-10 años de ensayos clínicos [4]. El proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas con blancos moleculares específicos puede dividirse en diferentes pasos, tal como se muestra en la *Figura 1*. A continuación se describen en detalle las etapas de un proyecto de diseño de drogas con blanco molecular específico.

Selección y validación del blanco

El primer paso en un proyecto de diseño racional de drogas consiste en la selección y validación del blanco. Este paso es el más importante a la hora de embarcarse en el desarrollo de nuevas drogas, ya que de esta decisión depende en gran parte el éxito del proyecto [4]. El término "blanco molecular" es un término amplio que se refiere a un abanico de entidades biológicas, incluyendo a proteínas, genes y azúcares, siendo las proteínas los blancos más utilizados [5].

Se pueden enumerar varios factores a tener en cuenta para la selección del blanco que se pueden dividir en dos grupos. Por un lado, es necesario pensar si ese blanco es relevante biológicamente considerando toda la evidencia disponible y por otro, si es posible modular o inhibir ese blanco en pacientes.

Con respecto al aspecto biológico, los blancos moleculares pueden surgir tanto de investigaciones dirigidas por hipótesis como de pesquisajes al azar de nuevos blancos moleculares. Actualmente, se cuenta con la secuenciación completa del genoma del cáncer y se identificaron oncogenes importantes y normalmente mutados en varios tipos de cáncer [6, 7]. Muchas de estas mutaciones se conocían anteriormente, valorizando el concepto de "adicción oncogénica" acuñado por Weinstein en el año 2000 [8]. Este concepto sostiene

que, a pesar de presentar una variedad en lesiones genéticas típicas en cáncer, algunos tumores dependen fuertemente de un único oncogén dominante para el crecimiento y la supervivencia. Esta noción indicaría que la inhibición de este oncogén específico es suficiente para prevenir el desarrollo neoplásico [9]. Sin embargo, evidencias clínicas demuestran que el diseño de terapias dirigidas a una única oncoproteína mutada en general no es exitoso a largo plazo, debido a la aparición de mecanismos de escape y de resistencia a drogas. Esto pone en discusión estrategias adicionales para el desarrollo de nuevas drogas dirigidas, tales como la combinación de drogas.

Por otro lado, también se ha postulado el concepto de "adicción no oncogénica". Este modelo sugiere que existen una variedad de genes o vías de señalización que no presentan actividad oncogénica per se, pero son esenciales para el mantenimiento del fenotipo transformado y por eso se convierten en blancos moleculares atractivos. En este concepto también está incluida la noción de "letalidad sintética", que sostiene que algunos genes asociados al desarrollo tumoral le otorgan cierta vulnerabilidad a la célula tumoral, resultado en muerte celular solo cuando otro gen esta inactivado [10]. Esto permitiría pensar que solo aquellas células que presenten modificaciones en genes supresores tumorales son sensibles a la inhibición de cierto blanco molecular. El ejemplo más conocido es que tumores con mutaciones en BRCA1 y BRCA2 se vuelven más dependientes a la polimerasa PARP y por eso, son más sensibles a inhibidores de PARP que células normales, incluso cuando la expresión o la actividad no están incrementadas en estos tumores [11]. Esta prueba de concepto fue validada en la clínica, utilizando un inhibidor de PARP-1 (Olaparib®, AstraZeneca) en pacientes con cáncer de ovario con BRCA mutado [12].

Una vez identificado el blanco, la validación del mismo es indispensable para poder avanzar en el proyecto de diseño de drogas. Para ello, en general se utilizan una serie de herramientas que van desde ensayos *in vitro*, *in vivo* y determinaciones en pacientes [5]. Los mejores resultados provienen de un enfoque de validación multifuncional, utilizando diferentes herramientas como las que se enumeran en la *Figura 2*.



Figura 2|Herramientas para la validación del blanco. La validación del blanco es un proceso multifuncional, en el que se utilizan diferentes herramientas disponibles. Modificado de Hughes *et al*, 2011

Una vez establecido que el blanco de interés es importante en la biología del tumor, el segundo paso importante es determinar si es posible modular farmacológicamente el blanco, es decir si el blanco es "drogable". Tradicionalmente, se define como blanco drogable a aquel que presenta una cavidad o bolsillo en la cual se logra posar y unir con afinidad una pequeña molécula [13]. A partir de la secuenciación del genoma humano se utiliza el término "genoma drogable" para referirse a aquellos genes que codifican para proteínas relacionadas a enfermedades que podrían ser moduladas por moléculas pequeñas. En este sentido, de los aproximadamente 30.000 genes del genoma humano, ha sido estimado que alrededor de 10% expresan "proteínas drogables"[14], sin tener en cuenta cuantas de estas proteínas tienen un rol relevante en la biología tumoral.

La drogabilidad de una proteína no puede ser predicha con precisión, especialmente si no se cuenta con una gran información estructural del blanco [3]. Cabe destacar que el concepto de drogabilidad no es algo estático sino que se va adaptando a las experiencias exitosas que se van logrando a lo largo del tiempo. Por ejemplo, inicialmente las proteínas quinasa eran consideradas no drogables y hoy en día los inhibidores competitivos de ATP constituyen el grupo de moléculas con actividad sobre vías de señalización más importantes en la clínica [15].

Una vez determinado que el blanco de interés biológico es drogable, es importante determinar cuál va a ser la "cascada de tests biológicos o cascada de screening" a la que van a ser sujetos los posibles candidatos de drogas para determinar la inhibición del blanco molecular elegido. Esta etapa es específica para cada blanco molecular y cada estrategia de screening. Estos tests deben presentar el suficiente rendimiento y fidelidad, particularmente si se pretende llevar adelante un screening de grandes cantidades de compuestos. Estos ensayos deben ser

cuantitativos para luego poder mejorar potencia, selectividad y parámetros fisicoquímicos de las moléculas evaluadas.

Drogabilidad y drug-likeness

Tal como se explicó anteriormente, un buen blanco debe ser eficaz, seguro, cumplir con necesidades clínicas y ser drogable. El concepto de drogabilidad surge en la década de los 1990s a partir de los grandes fracasos de las farmacéuticas en ensayos clínicos debido a características en la farmacocinética de las drogas evaluadas. Esto llevó al análisis de las características de aquellas drogas que exitosamente habían pasado los ensayos clínicos e incluso ya estaban disponibles en el mercado, dando como fruto el trabajo seminal de Lipinski y colaboradores [16], en el cual se llega a la conclusión sorpresiva que cuatro simples parámetros fisicoquímicos estaban presentes en el 90% de las drogas disponibles oralmente que habían alcanzado fase II, casualmente dichos parámetros correspondían con valores múltiplos de cinco. Esto dio lugar a las llamadas "reglas de Lipinski" (o del inglés RO5 "Rule of Five") [16]. Los compuestos que cumplen con estas características, se denominan compuestos "tipo-droga" o "drug-like". Dichas reglas están enumeradas en la *Tabla I*. Es importante destacar, que si bien se consideran como una guía valiosa para la selección de compuestos, presentan ciertas limitaciones [13].

Tabla I. Características de compuestos tipo droga

Compuestos tipo-droga o drug-like

Reglas de Lipinski:

- Peso molecular ≤ 500
- LogP ≤ 5
- Grupos donores de puentes de hidrógeno dentro de la molécula ≤ 5
- Grupos aceptores de puentes de hidrógeno (suma de átomos de N y O)
 dentro de la molécula ≤10

Targeting de blancos drogables

Los sistemas biológicos contienen diferentes tipos de macromoléculas que pueden ser modulados utilizando pequeñas moléculas, sin embargo la mayoría de las drogas desarrolladas se unen a o modifican la actividad de una proteína.

La característica distintiva de las proteína blanco que son consideradas drogables es la presencia en una invaginación rodeada de residuos aminoacídicos hidrofóbicos en su superficie expuesta al solvente, es decir, una superficie accesible denominada bolsillo hidrofóbico [17]. Los blancos moleculares más populares son enzimas que presentan una actividad definida, ya que contienen bolsillos conocidos de unión a sustratos y a moduladores [18].

Los blancos que virtualmente eran considerados no-drogables son las interacciones proteína-proteína o PPI (PPI, del inglés Protein-Protein Interaction)[18]. Estas interacciones son atractivas para el desarrollo de inhibidores, ya que presentan un rol importante en numerosos procesos celulares.

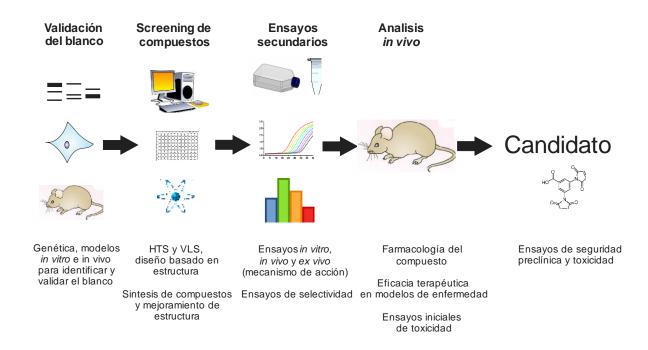


Figura 3|Resumen de los pasos necesarios en un pesquisaje de drogas. Etapas preclínicas de un proyecto de desarrollo de drogas. Modificado de Hughes, 2012

Sin embargo, varios factores contribuyen a considerar a la inhibición de PPI como un desafío inalcanzable, entre los cuales se encuentran la falta de moléculas endógenas que sirvan como molde para el diseño de nuevos inhibidores, la interfase llana sin bolsillos típicos y la gran superficie que habría que cubrir para interferir en la interacción. Este último punto constituye uno de los mayores desafíos ya que las superficies de contacto entre proteínas se extienden por ~1500-3000 Ų, mientras que las superficies implicadas en la interacción proteína-inhibidor es de ~300-1000 Ų [19]. Sin embargo, varios estudios estructurales mostraron que si bien la superficie de interacción entre dos proteínas es extensa, solo una porción de dicha superficie es la que contribuye a la unión con alta afinidad ("hot spot") y en general, esta presenta una extensión menor. Esto

permite considerar que son esos *hot spots* los susceptibles a ser "drogados", ya que se pueden identificar los residuos aminoacídicos claves involucrados en la interacción. Por otro lado, si bien se considera que la superficie de contacto entre las proteínas es rígida y no presenta cavidades, existen numerosos estudios que muestran que dicha unión es adaptable y que las proteínas poseen flexibilidad en dicha unión, mostrando que las interacciones efectivamente son susceptibles a la modulación [20]. Existen varios ejemplos de inhibidores de PPI siendo evaluados en estudios preclínicos [21, 22] y actualmente se cuentan con varios ejemplos de inhibidores de este tipo entrando en fases clínicas [23].

Generación de Hits y compuestos líderes

Tal como se muestra en la *Figura 3*, una vez elegido el blanco es necesario elegir la estrategia para obtener compuestos químicos con la capacidad de modularlo. Estos compuestos identificados inicialmente son denominados "Hits". Un "Hit" es un compuesto que presenta una actividad inicial por encima de cierto umbral propuesto para cierto ensayo de pesquisaje. Posteriormente, se verifica esta actividad en particular y este compuesto se denomina "hit validado" [24]. Actualmente se conocen varias estrategias diferentes que resultaron en el desarrollo exitoso de nuevas drogas. Conceptualmente hay dos tipos de estrategias diferentes para el pesquizaje de hits: diseño basado en conocimiento del blanco y/o ligando y, por otro lado, el *screening* al azar. Es decir, en el primer caso la búsqueda se basa en información previa mientras que en el segundo caso, no se necesita información del blanco porque sólo se busca un cierto efecto.

A continuación se citan dos estrategias de búsqueda comúnmente utilizadas en el desarrollo de drogas: *Screening* de alta performance (High Throughput *Screening*) y *Screening* virtual.

Screening de alto rendimiento (HTS: High Throughput Screening)

Actualmente el *screening* de alto rendimiento o HTS está consolidado como la tecnología más aplicada para el desarrollo de drogas. HTS se basa en el pesquisaje de millones de compuestos (bibliotecas de compuestos) utilizando una plataforma automatizada basada en ensayos *in vitro* utilizando un formato multiplaca de 348 wells [24]. Típicamente, se llevan a cabo ensayos con pequeñas moléculas a concentraciones 1-50 μM y se considera un *cutoff* de 30-50% de actividad para identificar aquellos hits que luego van a ser confirmados nuevamente y posteriormente validados [25].

Es importante destacar que luego de obtener los hits, estos compuestos entran en una etapa denominada *Hit-to-Lead* (H2L), en la cual los hits sufren modificaciones menores con el objetivo de mejorar la afinidad, la selectividad y la vida media de los compuestos y así identificar compuestos líderes promisorios [25]. Por definición, un compuesto líder es una estructura química prototípica o una serie de estructuras que muestran actividad y selectividad en ensayos bioquímicos y/o biológicos. Este compuesto es susceptible a modificaciones, logrando su optimización con el objetivo de encontrar un candidato para llevar a la clínica [24].

Las mayores ventajas que presenta el HTS son que al final del *screening* se obtienen varios hits que luego siguen el camino tradicional de desarrollo de drogas y que esta estrategia permite ser aplicada tanto a blancos conocidos como en búsquedas al azar. Sin embargo, es una tecnología extremadamente cara y por eso

en general es abordable únicamente en la industria farmacéutica. Por otro lado, se obtienen frecuentemente falsos positivos y esto requiere una optimización estricta de los ensayos de HTS. Con respecto al tiempo que lleva a realizar este tipo de screening depende del blanco y de los ensayos de *screening*, pero de manera general, un *screening* de ~1.000.000 moléculas lleva 1-3 meses [26].

De esta estrategia, se conocen varios casos exitosos que están siendo evaluados en ensayos clínicos como inhibidores de HSP90, PI3 kinasa y la vía de Hedgehog, mientras que varios llegaron al mercado como Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca), Erlotinib (Terceva®, Roche), Sorafenib (Nexavar®, Bayer)[26], entre otros.

Screening Virtual (VLS, Virtual Library Screening)

El término "screening virtual" fue acuñado en la última parte de los 1990s, cuando las metodologías computacionales evolucionaron lo suficiente para poder ofrecer una alternativa a las estrategias experimentales conocidas como HTS, que comenzaron a presentar rendimientos menores y costos mayores. Se define como screening virtual a la selección de compuestos de grandes bases de datos utilizando herramientas computaciones para predecir su capacidad de unión a un blanco macromolecular [27]. Esta selección se lleva a cabo utilizando algoritmos que puntúan (scoring) y clasifican (ranking) moléculas de grandes bibliotecas de acuerdo a su probabilidad de presentar afinidad por cierto blanco [28].

Existen dos tipos de abordajes computacionales que se diferencian conceptualmente: *screening* basados en el ligando y *screening* basados en el blanco. Ambos requieren de información previa, al contrario de lo que sucede en otras estrategias como HTS [29].

Los pesquisajes basados en ligandos seleccionan compuestos de bases de datos que están relacionados con un ligando conocido para el blanco en cuestión. En este sentido, las moléculas de una base de datos se puntúan de acuerdo a su similaridad con uno o múltiples ligandos activos y luego son clasificados de tal forma que reflejan una probabilidad de actividad decreciente. Esta estrategia está basada en el principio de similaridad: compuestos similares probablemente provoquen efectos similares. Existen diferentes algoritmos que posibilitan el scoring y ranking de los compuestos [30].

Por otro lado, los pesquisajes basados en el blanco (también conocidos como "basados en estructura") utilizan las herramientas informáticas para evaluar la posible unión de las moléculas al blanco elegido, tal como se muestra en la *Figura 4*. Esta estrategia de *screening* comienza con la identificación del posible sitio de unión en la macromolécula blanco. Es imprescindible contar con información estructural 3D acerca del blanco a ser evaluado. El escenario más sencillo es cuando se cuenta con la estructura determinada experimentalmente por cristalografía de rayos X o RMN [29]. En el caso que no se cuente con la información estructural experimental de la proteína blanco, es posible utilizar modelos de homología [31].

Si bien se conocen diferentes metodologías computacionales de *screening* virtual basado en estructura, el *docking* es una metodología clave y ampliamente utilizada [32]. El *docking* se basa en la predicción de la conformación y orientación (pose) de un cierto ligando en un sitio de unión específico. Este proceso comienza con la aplicación de algoritmos de *docking* que "posan" los compuestos en el sitio activo, considerando todas las posibles conformaciones (confórmeros) y posteriormente se complementa con una función de puntuación o *scoring* que está diseñada para predecir la actividad biológica a través de la evaluación de

interacciones entre los compuestos y el blanco potencial. Las funciones de *scoring* simples evalúan las poses en función a la forma y la complementariedad electrostática, mientras que esquemas de *scoring* más complejos que se aplican incluyen interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals y efectos de entropía y solvatación. Posteriormente, estos resultados se clasifican generando una lista de posibles candidatos ordenada en cuanto a la afinidad por el blanco. Esta lista se elabora a partir de valores de ranking, un proceso que intenta estimar la energía libre de unión al blanco de la manera más precisa posible [33]. De esta lista ordenada, se eligen un número determinado de hits para ser evaluados *in vitro*.

Durante la última década se desarrollaron un gran número de programas de docking. Entre los más populares se pueden citar a AutoDock, Dock, FlexX, Glide, Gold, Surflex, ICM, LigandFit y eHiTS [32]. Cada uno de ellos presenta diferentes características: desde los algoritmos utilizados hasta los recursos informáticos necesarios para poder realizar un screening de miles de moléculas, incluso muchos de ellos son de libre acceso para el sector académico. Todos estos factores son tenidos en cuenta en el momento de elegir el programa de docking a utilizar.

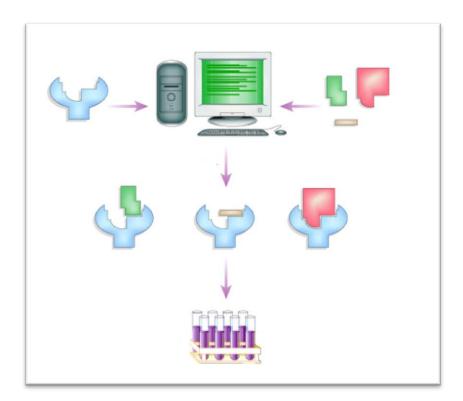


Figura 4|Screening virtual basado en *docking*. Bibliotecas de compuestos son evaluados por metodologías computacionales de *docking* para determinar la afinidad de compuestos por el blanco deseado. Cada compuesto es evaluado en miles de posibles conformaciones (confórmeros) y puntuados (*score*) en base a su complementariedad con su blanco. De los cientos de miles de moléculas de la biblioteca, unas decenas de ligandos con scores altos (hits) son evaluados experimentalmente en búsqueda de su actividad *in vitro*. Modificado de Shoichet, 2004.

Una vez que fue elegido el blanco, que se cuenta con su información estructural, inlcuyendo al sitio específico a modular, y que está elegido el programa de *docking*, es importante determinar la base de datos a utilizar. El contenido y la calidad de las bibliotecas de compuestos juegan un rol preponderante en el éxito de un proyecto de *screening* virtual. Actualmente se cuenta con numerosas bases de datos disponibles [32]. Estas bases de datos

contienen una gran cantidad de pequeñas moléculas variando de varias decenas de miles a varios millones. Un pesquisaje completo de estas bases de datos resultaría en una pérdida de tiempo y de recursos computacionales. Es por eso, que se aplican filtros para remover aquellos compuestos indeseables y seleccionar solo aquellos compuestos relevantes en la biblioteca. Algunas de las características indeseables son: la presencia de grupos muy reactivos o tóxicos, moléculas muy grandes o muy hidrofóbicas o muy flexibles [32].

Algunas drogas desarrolladas por *screening* virtual ya se encuentran en el mercado, mientras que la mayoría se encuentran en fases preclínicas y clínicas. El primer caso exitoso de una droga desarrollada a partir de un *screening* virtual es el antiviral zanamivir (Relenza®, GlaxoSmithKline) para el tratamiento de la gripe común y la profilaxis del virus A y B y fue desarrollado utilizando un *screening* virtual basado en estructura [27].

Optimización del líder y ensayos preclínicos

La optimización de una estructura líder implica una serie de rondas de diseño, síntesis y evaluación para llegar al candidato deseado. Esta estrategia se define como optimización multiparamétrica, en donde se requiere la optimización simultánea de selectividad, tolerabilidad, biodisponibilidad y estabilidad metabólica del compuesto para lograr una droga segura y eficaz[3].

Actualmente, la evaluación preclínica de líderes y candidatos a droga se llevan adelante utilizando líneas celulares tumorales establecidas, buscando efectos sobre algún evento celular. Aquellos compuestos que muestran tener actividad en ensayos basados en células, progresan a estudios en animales. Los modelos animales históricamente utilizados fueron los modelos murinos tanto

singénicos como xenogénicos. En ambos casos, los tumores se establecen a partir de las líneas celulares antes descriptas. Actualmente, se comenzaron a establecer tumores en animales inmunodeprimidos a partir de biopsias frescas de pacientes con el objetivo de maximizar la retención de las características de los tumores en pacientes. Estos modelos se denominan PDX (del inglés, *Patient-Derived Xenografts*). Otro de los modelos que permiten completar los datos de los modelos xenogénicos son los modelos genéticamente manipulados o GEMMs (del inglés, *genetically engineered mouse models*), que se basan en modificar (mutar, delecionar o sobreexpresar) uno o más genes para lograr replicar alteraciones normalmente encontradas en tumores humanos.

En esta etapa del proyecto, es importante determinar las propiedades ADMETox (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excresión y Toxicidad), es decir las características farmacocinéticas del compuesto. En este sentido, metodologías computacionales permiten predecir estas propiedades al mismo tiempo que permiten optimizar análogos.

Una vez que el candidato preclínico fue identificado y se cuenta con una gran cantidad de datos preclínicos, se prosigue con la presentación de los datos en agencias regulatorias para el desarrollo de ensayos clínicos.

Ensayos clínicos de drogas dirigidas: cambio de paradigma

Con el desarrollo de las terapias dirigidas, el diseño de ensayos clínicos requerirá cambios fundamentales con respecto a los ensayos clínicos tradicionales utilizados en la evaluación de drogas citotóxicas convencionales [34].

Tanto en la elección de los pacientes como los puntos finales de cada una de las etapas antes descriptas y aplicadas en la evaluación de drogas antitumorales

tradicionales parecen no ser las apropiadas para el diseño de los ensayos clínicos de drogas con blancos moleculares específicos. Varios autores destacan la importancia de pasar de la clasificación de los pacientes por sitio anatómico y por características histológicas a la estratificación de pacientes basada en aberraciones genómicas y otras características moleculares relevantes. También se jerarquiza la necesidad de la utilización de biomarcadores fiables y robustos en todas las fases del ensayo clínico [35, 36]. Particularmente importante es contar con la identificación de biomarcadores robustos río abajo del blanco y así determinar el efecto de la nueva droga.

En los últimos años, se discutió profundamente la utilización de biomarcadores subrogados en los ensayos clínicos. Los marcadores subrogados de punto final permiten reemplazar al punto final clínico *per se* y miden la efectividad de la droga a estudiar en un ensayo clínico [37, 38]. Falta aún mucho trabajo para validar dichos biomarcadores, pero prometen convertirse en una herramienta clave para el desarrollo de ensayos clínicos, particularmente para drogas con blancos moleculares específicos.

Esto indica que debe efectivizarse un cambio de paradigma en el diseño de ensayos clínicos para drogas dirigidas en la búsqueda de un desarrollo clínico más eficiente y lógico.

Cáncer

El término genérico "cáncer" designa a un amplio grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo. Las células transformadas presentan como característica principal el crecimiento anormal y aumentado dando lugar a la formación de un tumor. Sin embargo, no todos los tumores son malignos. Las neoplasias benignas son aquellas que se circunscriben a la localización original presentando un límite definido en la arquitectura tisular que las rodea, mientras que las neoplasias malignas están originadas por células agresivas con capacidad de invadir los tejidos circundantes, diseminarse y formar focos metastásicos en sitios distantes [39].

En el año 2012 el cáncer fue responsable de 8.2 millones de muertes estimadas a nivel mundial. Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta, de acuerdo a las estimas realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) para el año 2012. En nuestro país, murieron por cáncer casi 62000 hombres y mujeres ese año [40].

En magnitud, el volumen más importante de casos estimados en Argentina corresponde al cáncer de mama con más de 18.700 casos nuevos por año (18% del total y 36% del total de casos en mujeres). En incidencia, el cáncer de mama es seguido por el de próstata (13% del total), el de colon y recto (10.5%) y pulmón (10%). Por otro lado, la incidencia de tumores primarios en el sistema nervioso central (SNC) muestran una incidencia del 1.4% [40].

Con respecto al cáncer pediátrico, según datos del Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA) se registraron 12.776 niños con patología oncológica en el periodo 2000-2009, siendo los tumores pediátricos más frecuentes las leucemias (30-40%), seguido por los tumores cerebrales (20%) y los linfomas

(13%). Los tumores del sistema nervioso central presentan la menor probabilidad de sobrevida de todos los tumores pediátricos según el ROHA (46% de sobrevida a los 36 meses después del diagnótico)[41].

El cáncer se caracteriza por ser una enfermedad compleja en donde intervienen diferentes factores. Los tumores comparten ciertas capacidades biológicas que se manifiestan lo largo de su desarrollo. Las células cancerosas presentan capacidad proliferativa sostenida, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa ilimitada, capacidad de inducir angiogénesis y de activar la invasión y metástasis. A estas características esenciales se agrega la inestabilidad genómica que presentan estas células, el microambiente que favorece la progresión maligna (entorno inflamatorio y presencia de células que cooperan con el fenotipo transformado), la capacidad de las células tumorales de reprogramar el metabolismo celular y de evadir la respuesta inmune del organismo [2]. Si bien estas características se encuentran presenten en una gran mayoría de tipos tumorales, no son aplicables a todos ellos. Un ejemplo de ello son los tumores del sistema nervioso central, que rara vez metastatizan [42].

El desarrollo de este trabajo se centró en dos tipos de neoplasias diferentes y a continuación se detallan características de la biología tumoral del carcinoma mamario y del glioblastoma.

Carcinoma mamario

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más comunes con más de 1.300.000 casos y 450.000 muertes anuales a nivel mundial [43]. Las neoplasias

mamarias son una enfermedad clínicamente heterogénea, ya que existen diferentes subtipos que presentan diferentes perfiles moleculares, histopatológicos, comportamientos biológicos, perfiles de riesgo y pronóstico [44].

Clínicamente, esta enfermedad se categoriza en tres tipos básicos diferentes utilizando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), dependiendo de la expresión de ciertos receptores [45]. En el primer tipo se agrupan todos aquellos subtipos que expresan el receptor de estrógeno (ER+) y progesterona (PR+). En este grupo se encuentran el 70-80% de los casos de cáncer mamario. En el segundo grupo se hallan los tumores que presentan una amplificación del gen her2/erbB2. Este grupo representa el 10-15% de los pacientes de cáncer mamario. El 10-15% restante de los tumores mamarios se clasifican en el tercer grupo denominado triple negativo se caracteriza por no expresar el receptor de estrógeno (ER), ni el de progesterona (PR) ni el receptor HER2 [46].

Con el desarrollo de tecnologías de microarreglos basada en marcadores genómicos, se lograron clasificar con mayor exactitud los diferentes subtipos de cáncer mamario en 5 grupos: carcinoma mamario de tipo luminal A, de tipo luminal B, de tipo Basal, de tipo HER2 y de tipo normal [47]. Esta nueva clasificación promete realizar mejores diagnósticos y diseñar terapias más específicas en búsqueda de estrategias terapéuticas más efectivas y evitar la quimioterapia adyuvante en aquellos casos en los que no es necesaria.

Si bien estas características histopatológicas y/o genómicas permiten realizar un diagnóstico y diseñar una estrategia terapéutica, la causa de muerte de estas pacientes no es el tumor primario sino las metástasis en sitios distantes. Los sitios metastásicos más frecuentes para tumores primarios mamarios son hueso, pulmón e hígado. Aproximadamente 10-15% de los pacientes con cáncer de mama desarrollan metástasis dentro de los primeros 3 años de la detección inicial de

tumor primario. Aunque existen casos en los que la manifestación de metástasis se dan hasta 10 años posteriores al primer diagnóstico [48].

Metástasis

El estudio de cómo las células tumorales avanzan hacia el fenotipo metastásico, es decir comenzando por la alteración del microambiente del tumor primario, seguido por la entrada en circulación y colonización de un órgano distante, se remonta al siglo pasado. Desde ese momento, numerosos estudios dieron lugar a una serie de teorías sobre la progresión metastásica y, sin embargo, hoy en día no se conoce el fenómeno por completo. A pesar de ello, se identificaron algunos prerrequisitos de las células tumorales para que tenga lugar el proceso metastásico, los cuales se enumeran a continuación (*Figura 5*).

En primer lugar, las células deben contar con la capacidad de iniciar un nuevo tumor, ya que sólo unas pocas células colonizan el sitio metastásico distante y a partir de ellas se debe formar la masa tumoral. En este sentido, existen evidencias de que en algunos tipos tumorales se encuentran células tipo *stem* con capacidad de auto renovación [49]. Aunque está en discusión la abundancia relativa de este tipo de células en tumores sólidos primarios, la capacidad de autorenovación es indispensable para la implantación del nuevo foco. Otro de los prerrequisitos es que las células deben mostrar una disminución en la adhesión intercelular y de esta forma poder alterar la arquitectura tisular y avanzar hacia la progresión maligna. Las moléculas de adhesión E-cadherina e integrinas se constituyen como mediadores importantes en el fenotipo maligno. Las células con capacidad metastásica deben ser resistentes a las señales extracelulares de muerte celular (apoptosis), así como también deben presentar la capacidad de perturbar la membrana basal y la matriz extracelular, donde las metaloproteasas de matriz (MMP) juegan un rol preponderante [50].

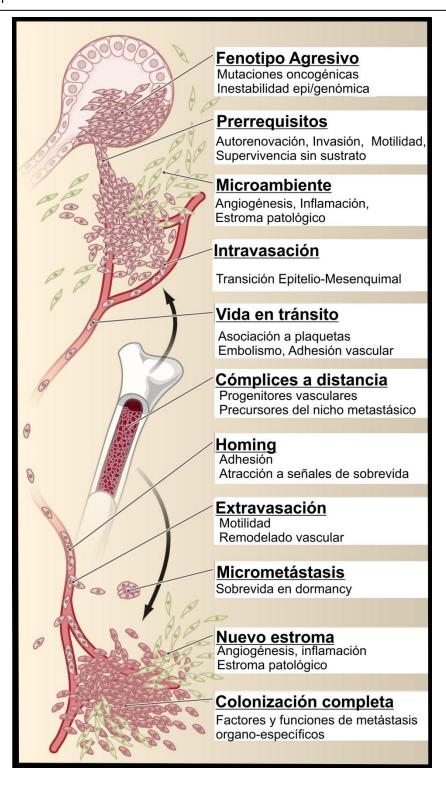


Figura 5 | Pasos de la progresión metastásica. El proceso metastásico progresa en la medida que las células tumorales adquieren capacidades diferentes para colonizar un sitio distante. Modificado de Gupta & Massagué, 2006.

Uno de los pasos fundamentales de la metástasis es el "movimiento" de las células de un sitio a otro, es decir que las células deben tener capacidad migratoria. La migración celular involucra cambios dinámicos en el citoesqueleto, en las interacciones célula-matriz, proteólisis localizada, contracciones de actina-miosina y el desensamblaje de contactos focales. Todos estos cambios están modulados por una serie de nodos fundamentales que incluyen a las pequeñas Rho-GTPasas (como Rho, Cdc42 y Rac), integrinas en las adhesiones focales, proteasas de membrana, proteasas secretadas y la maquinaria contráctil de la actomiosina.

Si bien las características antes descriptas son esenciales para el fenotipo metastásico de una célula tumoral, el proceso es más complejo. Las interacciones de las células tumorales con su estroma son claves. La presencia de células mesenquimales (fibroblastos) y células del sistema inmune (leucocitos, linfocitos, macrófagos, etc.), asociadas a un escenario de inflamación crónica juegan un rol preponderante en la progresión tumoral.

Las células tumorales que tienen la capacidad de intravasarse y entrar en circulación, también deben ser resistentes a la anoikis (muerte celular por pérdida de adhesión al sustrato). En este paso, las células tumorales interactúan con células normales del paciente, por ejemplo con las plaquetas. Una vez en el órgano blanco, las células deben traspasar el endotelio y extravasarse. La mayoría de las células una vez extravasadas, no tienen la capacidad de colonizar efectivamente el nuevo sitio. Estas células o micrometástasis pueden mantenerse en un estado "dormido" (dormancy) por varios años antes de convertirse en una metástasis detectable o incluso muchas de ellas nunca progresan. Estas células deben tener la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), salir del estado de quiescencia en el que se encuentran para luego poder proliferar y volver a generar una interacción fructífera con el estroma del nuevo sitio colonizado [50].

Terapéutica actual del cáncer mamario

En la actualidad, el tratamiento para el cáncer mamario incluye cirugía, radioterapia y terapia adyuvante. La terapia elegida está basada en la determinación de la expresión de receptores por IHQ [46]. Existen tres tipos de terapias sistémicas para el cáncer mamario: terapia hormonal, quimioterapia y terapia dirigida.

La terapia hormonal explota la presencia de los receptores de estrógeno y/o progesterona en los tumores, permitiendo la utilización del antagonista estrogénico Tamoxifeno y de los inhibidores de aromatasa que bloquean la síntesis de estrógeno. Los agentes antihormonales concomitantes con quimioterapia son la estrategia terapéutica más utilizada para tumores mamarios ER+ y PR+. También se utiliza como tratamiento de segunda línea el Fulvestrant (Faslodex®, AstraZeneca), un antagonista puro del receptor de estrógeno[51].

La quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas (por ej. doxorrubicina) se convirtió en la más utilizada desde los años 1990s. Estos agentes se los combina con taxanos (docetaxel, paclitaxel) y ciclofosfamida, así como también con 5-fluorouracilo. Actualmente se utiliza quimioterapia como neoadyuvante, adyuvante y en escenarios metastásicos [51].

Con respecto a las terapias dirigidas, se destaca la utilización del anticuerpo monoclonal anti HER2 Trastuzumab (Herceptin®, Roche) para aquellos tumores mamarios que presentan la amplificación en este gen. También se aprobó como tratamiento de primera línea la combinación del anticuerpo monoclonal anti VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) Bevacizumab (Avastin®, Genentech/Roche) con paclitaxel en pacientes con cáncer mamario metastásico HER2 negativos. Inhibidores de tirosina quinasa también fueron aprobados para el

tratamiento de cáncer mamario. Un ejemplo de ellos es el inhibidor Lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline), que es inhibidor de HER1 y HER2 [51].

Si bien se desarrollaron en las últimas décadas estrategias terapéuticas muy eficaces para el cáncer mamario, aquellos tumores triple negativos (ER-, PR- y HER-) siguen siendo difíciles de tratar ya que se trata de una enfermedad biológicamente agresiva con pocas opciones terapéuticas. Actualmente la quimioterapia es la única herramienta disponible, sin embargo las respuestas siguen siendo limitadas. Los tumores triple negativos presentan un aumento en el riesgo de metástasis en sistema nervioso central comparado con otros subtipos de cáncer mamario [52].

Otro de las problemáticas en el tratamiento del cáncer mamario es la resistencia intrínseca o adquirida de los tumores a las terapias hormonales, quimioterapia y/o terapias dirigidas. Los mecanismos de resistencia son complicados y recién se comienzan a comprender algunos de ellos. En varios casos, la resistencia no solo depende de alteraciones en los receptores hormonales o en receptores de factores de crecimiento, sino que diferentes vías de señalización están implicadas en esta resistencia [53-55]. Incluso muchas de estas vías de señalización compensatorias están implicadas en la resistencia a quimioterapia tradicional de tumores mamarios triple negativos[52].

Gliomas

Los glioblastomas (o glioblastoma multiforme – GBM) son los tumores más comunes del sistema nervioso central (SNC) y también los más letales. Si bien presentan una incidencia baja, los gliomas malignos son esencialmente incurables:

presentan una sobrevida media de 9 a 12 meses y una tasa se sobrevida a 5 años menor al 5%, a pesar de todos los esfuerzos terapéuticos disponibles [56].

histológicamente Los gliomas malignos son tumores invasivos e heterogéneos derivados de células gliales, que comúnmente se encuentran en el hemisferio cerebral anterior. La Organización Mundial de la Salud clasifica a los gliomas de acuerdo al tipo celular a partir del cual se hipotetiza se dio lugar a la diferenciación, es decir, si los tumores muestran características astrocíticas, oligodendrogliales o de células ependimales. Estos tumores se estratifican desde el grado I al IV, de acuerdo al grado de malignidad dado por características histológicas. Según la OMS, los tumores astrocíticos de grado I (astrocitoma pilocítico) representan a tumores biológicamente benignos que se curan quirúrgicamente; los tumores de grado II (astrocitoma difuso) son malignos pero de bajo grado, que no son curables quirúrgicamente pero el curso clínico es largo; los tumores de grado III (astrocitoma anaplásico) son malignos y llevan a la muerte al curso de algunos años; los tumores grado IV (glioblastoma) son altamente invasivos, resistentes a la guimioterapia y letales en 9 a 12 meses. Contrariamente a lo que sucede en otros tumores sólidos, los gliomas raramente metastatizan fuera del SNC y por ello, el grado del tumor es determinante en resultado clínico [42]. Tanto los gliomas de grado III como de grado IV son considerados malignos.

Los glioblastomas pueden separarse en dos subtipos: primarios y secundarios (*Figura 6*). Los glioblastomas primarios típicamente se presentan en pacientes mayores a 50 años, como tumores agresivos, altamente invasivos, sin evidencias previas de enfermedad clínica. Por otro lado, los GBMs secundarios se presentan en pacientes más jóvenes con astrocitomas de grado bajo y en el transcurso de 5-10 años se transforman en glioblastomas, independientemente del tratamiento recibido.

Los glioblastomas se caracterizan por presentar una infiltración difusa a lo largo del parénquima cerebral, una angiogénesis robusta, una resistencia intensa a apoptosis, necrosis e inestabilidad genómica [57].

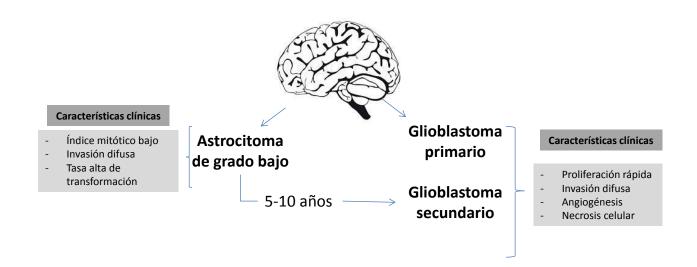


Figura 6 | Dos caminos para el mismo fenotipo. GBM puede desarrollarse a lo largo de 5-10 años a partir de un astrocitoma de grado bajo (GBM secundario) o puede ser la patología inicial al momento del diagnóstico (GBM primario). Las características clínicas del GBM son las mismas, independiente del desarrollo del tumor. Modificado de Maher *et al.*, 2001

La característica clave de estos tumores es su naturaleza invasiva, ya que repercute en el manejo terapéutico de la enfermedad. Esta infiltración de células tumorales impide que la cirugía remueva la masa tumoral completa, incluso cuando las lesiones aparecen en áreas donde la resección quirúrgica completa es posible. Esta invasión difusa local eventualmente lleva al crecimiento de un tumor recurrente en una localización adyacente a la cavidad de la que el tumor había sido resectado por cirugía [42, 58]. Evidencias de autopsias de pacientes con gliomas que nunca habían sido tratados demuestran que 25-50% los mismos presentaban

la enfermedad en ambos hemisferios, reforzando la idea de que los glioblastomas tienen una capacidad invasiva intrínseca [59].

Otra de las características importantes de los gliomas es su angiogénesis aumentada. Las células de glioma, tal como sucede en diferentes tumores sólidos, requieren vasos sanguíneos por motivos metabólicos y de eliminación de desechos. Sin embargo, también se postula que esta angiogénesis en los gliomas está dirigida por la necesidad de crear un nicho vascular que posiblemente mantenga selectivamente a las "glioma stem cells" [60].

Una de las grandes incógnitas de los gliomas es el origen celular del mismo. En este sentido, existen evidencias de que *stem cells* neurales o células progenitoras relacionadas pueden ser transformadas a cáncer *stem cells* dando lugar a la formación de gliomas malignos. Sin embargo se necesitan más evidencias para clarificar este tema y poder explicar la gran heterogeneidad histológica encontrada en los gliomas[59].

Patogénesis molecular

Tal como sucede en diferentes tipos de cáncer, la transformación maligna en gliomas resulta de la acumulación secuencial de aberraciones genéticas y la desregulación de múltiples vías de señalización. En este sentido, los defectos más comunes que se encontraron en vías de señalización intracelular están asociados a factores de crecimiento. El 50% de los pacientes con glioblastomas primarios presentan una amplificación del gen *EGFR* (receptor de EGF) y esta amplificación se asocia con mal pronóstico. El 50% de los tumores que presentan tal amplificación expresan una variante constitutivamente autofosforilada del receptor conocida como EGFRVIII, que carece del dominio extracelular de unión al ligando y la

expresión de esta variante confiere aún un peor pronóstico que la expresión del EGFR *wild type* [60]. El receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) también cumple un rol importante en la agresividad de los glioblastomas.

Las vías de señalización que se encuentran río abajo de estas vías de factores de crecimiento son las que median las funciones biológicas que le confieren malignidad al tumor. En este sentido, tanto la vía de las MAP-kinasas como la vía PI3K-Akt-mTOR presentan un rol central en la patogénesis molecular de gliomas. Por ejemplo, PTEN, un supresor tumoral que regula negativamente la vía de PI3K, se encuentra inactivo en 40-50% de los pacientes con glioblastomas [60].

Actualmente, se intenta clasificar a los glioblastomas teniendo en cuenta características moleculares. Sin embargo, todavía falta estudiar en profundidad los diferentes tipos de glioma para poder estratificarlos y determinar posibles respuestas terapéuticas de los diferentes pacientes.

Terapéutica actual de glioblastomas de alto grado

La cirugía es, en general, el primer paso terapéutico para extirpar el tumor y obtener tejido para realizar el diagnóstico. Posteriormente, los pacientes reciben radioterapia concomitante con temozolomida, un agente alquilante. Sin embargo, tal como se explicó anteriormente, los gliomas recurren inevitablemente un tiempo después a varios centímetros de la localización inicial del tumor [59].

En el último tiempo, al conocer con mayor profundidad la patogénesis molecular de los glioblastomas, se comenzaron a ensayar terapias dirigidas a blancos relevantes. Debido a que los glioblastomas son uno de los tumores más angiogénicos que se conocen, en el año 2009 se aprobó por la FDA la utilización de Bevacizumab (Avastin®, Roche), un anticuerpo monoclonal anti VEGF (factor de

crecimiento de endotelio vascular), para el tratamiento de segunda línea de gliomas recurrentes. Sin embargo, la utilización de este anticuerpo sigue bajo intenso estudio, ya que si bien tiene un impacto fuerte en la sobrevida libre de enfermedad, se desconoce el beneficio terapéutico real sobre la sobrevida total de los pacientes comparada con el control histórico [61].

Diferentes ensayos clínicos probaron inhibidores de receptores tirosina kinasa, sin embargo hasta el momento ninguno de ellos mostró un beneficio terapéutico en la sobrevida de los pacientes [61]. Actualmente se están evaluando en pacientes inhibidores de la vía PI3K-Akt-mTOR, pero aún se desconocen los resultados [60].

Es importante destacar, que en el tratamiento de gliomas, tal como sucede en el tratamiento de carcinoma mamario, resulta evidente la necesidad de contar con biomarcadores que permitan determinar las terapias específicas para cierto perfil molecular del glioma [60].

Rho GTPasas

Las pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras son proteínas pequeñas de alrededor de 21 kDa que funcionan como interruptores moleculares en un gran número de vías de señalización. Dentro de esta superfamilia se encuentran las proteínas Rho (*Ras homologous*), que se distinguen de otros miembros de la superfamilia Ras por la presencia de un dominio GTPasa tipo-Rho. Hasta este momento se identificaron 22 variantes humanas de la familia de Rho GTPasas y pueden ser subdivididas en 10 grupos considerando su identidad: Cdc42, Rac, RhoA, RhoD, Rif/RhoF, Rnd3/RhoE, TTF/RhoH, Chp/RhoV, Rho micondrial (Miro1/RhoT1) o RhoBTB. Los miembros más estudiados y caracterizados son Cdc42, Rac1 y RhoA [62].

Como sucede con la GTPasa Ras, las Rho GTPasas son interruptores moleculares que adoptan diferentes estados conformacionales en respuesta a la unión de GDP o GTP (*Figura 7*). Sólo en el estado activo unido a GTP, estas proteínas son capaces de unirse y activar a sus proteínas efectoras. Es importante destacar que muchas de las funaciones de las Rho GTPasas requieren del anclaje a membrana para ser funcionales. 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 clases de proteínas que regulan a las Rho GTPasas: factores intercambiadores de guanina (GEFs o *Guanosine Exchange Factors*), Proteínas activadoras de GTPasas (GAPs o *GTPase activating proteins*) e inhibidores de disociación de guanina (GDIs o *Guanine dissociation inhibitors*).

Los GEFs activan a las GTPasas catalizando la liberación del GDP y llevando a la formación de un complejo transicional inestable libre de nucleótidos. Debido a que la concentración citosólica de GTP libre es más alta que la de GDP, este

complejo se carga de una molécula de GTP logrando la activación de dicha proteína. La activación de GEFs está mediada por diferentes receptores de superficie, incluyendo receptores de citoquinas, receptores tirosin-kinasa, receptores de adhesión y receptores asociados a proteína G (GPCRs)[62].

Por otro lado las proteínas Rho son inactivadas mediante la hidrólisis de GTP a GDP, mecanismo generalmente coordinado por las proteínas GAP, las cuales estimulan la baja actividad hidrolítica intrínseca de las proteínas Rho. También se encuentran los RhoGDIs, que se asocian a las proteínas Rho citosólicas y las mantienen en la conformación en la que se encuentran, evitando cualquier cambio de nucléotidos o hidróslisis [63].

Si bien estas familias de proteínas cumplen un rol clave en la regulación de la actividad de las Rho-GTPasas, cabe destacar que existen otros mecanismos de regulación de estas GTPasas. La mayoría de los mecanismos alternativos están basados en modificaciones post-traduccionales y cada GTPasa presenta algunos de estos mecanismos. Por un lado están aquellas modificaciones que modifican su localización intracelular tales como la isoprenilación del extremo C-terminal y la fosforilación. Por otro lado, se pueden citar aquellas modificaciones que impactan sobre las propiedades bioquímicas y actividad, tales como la oxidación de residuos de cisteína, la sumolización y la degración por la via ubiquitina-proteasoma. Si bien no es una forma de regulación *per se*, es importante mencionar que existe un *crosstalk* entre las diferentes RhoGTPasas, donde diferentes GTPasas son capaces de estimular o inhibir a otro miembro de la familia [64].

• Citokinas • Factores de Crecimiento • Moléculas de Adhesión Integrinas Receptores acoplados Receptores a proteína G tirosina-quinasa GEF Rho-GDP Rho-GTP Efector

Figura 7|Modelo de regulación de Rho GTPasas. Las proteínas Rho actúan como transductores de señales al ser activados por GEFs, que responden a una gran variedad de estímulos extracelulares mediados por receptores de membrana. La conformación activa de las proteínas Rho es capaz de unirse a los efectores capaces de mediar diferentes respuestas biológicas.

Como se explicó anteriormente, cuando las proteínas Rho se encuentran activas y ancladas a membrana en la localización subcelular específica son capaces

de interactuar con diferentes efectores río abajo. Se conocen más de 70 efectores potenciales para las proteínas de la familia Rac1 y Rho. En este sentido, cada RhoGTPasa es capaz de activar un grupo definido de efectores y estos efectores pueden ser tanto efectores catalíticos (ej. quinasas como Pak1, activada por Rac1; la quinasa ROCK, activada por RhoA, entre otras) como efectores no catalíticos que funcionan como adaptadores o *scaffolds* (ej, Diaphanous, Was, Baiap2, entre otros) [65].

Funciones mediadas por la GTPasa Rac1

La Rho GTPasa Rac1 es uno de los miembros de la familia más estudiados. Es una proteína que se expresa en todos los tejidos y está relacionada con la regulación de múltiples funciones celulares (Figura 8).

Evidencias experimentales en modelos murinos transgénicos, muestran que la deleción del gen *Rac1* provoca letalidad embriónica causada por defectos en la gastrulación y por apoptosis de células mesodermales [66]. De manera más concreta, se estudiaron diferentes modelos *Rac1* knockout tejido-específicos. Rac1 cumple un rol importante en diferentes tipos celulares hematopoyéticos: sobre células stem hematopoyéticas, plaquetas, linfocitos B y T. También se demostró que es importante en el desarrollo vascular de células endoteliales y en la formación de las vainas de mielina en el sistema nervioso central [65].

Evidencias de células en cultivo permitieron profundizar estas observaciones funcionales de Rac1. Históricamente, Rac1 estuvo implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina, específicamente en la formación de lamelipodios que contribuyen de manera pivotal a la migración celular. En este sentido, un ligando extracelular como el EGF, el PDGF o insulina provocan la formación de lamelipodios

y ondulaciones de membrana a través de Rac1 [67]. De este rol importante en la regulación del citoesqueleto se desprende que Rac1 está involucrada en la regulación de procesos como endocitosis, tráfico de membrana, morfología celular, adhesión, *spreading* y polaridad celular, destacándose la regulación de la migración celular [63, 68].

Por otro lado, la vía de señalización de Rac1 afecta la proliferación celular a través de diferentes mecanismos. Rac1 modula la transcripción génica a través de la activación de NFkB, JNK y MAPK que inducen factores de transcripción AP1. Estos factores de transcripción modulan la expresión de proteínas que regulan la progresión del ciclo celular como ciclina D1 [69].

Rac1 también participa en otras funciones celulares. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) está regulada por Rac1, ya que esta proteína es esencial para la activación de la NADPH oxidadasa [70]. Recientemente, también se describió el rol de Rac1 en la modulación del metabolismo, ya que esta proteína regula la actividad de la enzima mitocondrial glutaminasa, enzima clave en el metabolismo de la glutamina [71].

En el último tiempo, se comenzaron a describir funciones nucleares de Rac1 además de las funciones citoplasmáticas más conocidas. Cuando se encuentra en el núcleo, Rac1 es capaz de interaccionar con la toposiomerasa II y está involucrada en la respuesta al daño a ADN provocado por varias drogas quimioterapéuticas que afectan el ADN [72].

Rho GEFs

El primer GEF de mamífero se identificó a principios de los años 90 como un gen transformante en células de linfoma de células B difuso y se denominó Dbl. Esta proteína mostró ser un GEF para la GTPasa Cdc42. A partir de ese momento, se identificaron 69 miembros diferentes de la familia Dbl en humanos. Esta familia de GEFs se caracteriza por contener un dominio DH (del inglés, *Dbl homology*) de unos 200 residuos y un dominio PH (del inglés, *pleckstrin homology*) adyacente de unos 100 residuos. El dominio DH es el responsable de catalizar el intercambio de GDP por GTP en las Rho GTPasas y mientras que el domino PH se propone como el responsable de la localización en la membrana plasmática de los GEFs así como de la regulación alostérica de la actividad de los GEFs. Fuera de los dominios DH-PH, las proteínas de la familia Dbl presentan una gran diversidad y normalmente contienen otros dominios responsables de funciones celulares características de cada GEF.

Posteriormente, se identificó una nueva familia de GEFs que no se relaciona en secuencia con la familia de proteínas Dbl: la familia DOCK. Esta nueva familia de proteínas carece de la presencia del dominio DH pero se caracterizan por dos regiones de secuencia conservada denominadas DHR1 y DHR2 (del inglés, *Dock homology region 1 y 2*). Existen 11 proteínas relacionadas a Dock en humanos y cada una de ellas presenta especificidad por una o más GTPasas. En la *Figura 8* se observan los GEFs relevantes en este trabajo.

Uno de los aspectos que se comenzó a estudiar hace más de 15 años y hoy en día sigue siendo objeto de estudio, es la manera en que los GEFs regulan a las GTPasas y cuáles son los elementos estructurales claves en el reconocimiento específico de cada GEF con cada Rho GTPasa. Por ejemplo, el GEF Tiam1 regula a Rac1 pero no a Cdc42, a pesar de compartir 70% de homología estructural [73].

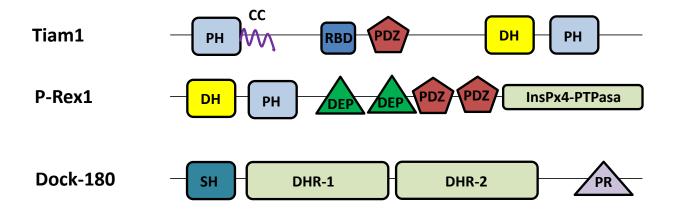


Figura 8 | Estructura de algunos GEFs relevantes en el trabajo. Se muestran ejemplos de las dos familias de GEFs: Tiam1 y P-Rex1 pertenecen a la familia de GEFs clásicos Dbl mientras que Dock-180 pertenece a la familia relacionada con Dock. Pleckstrin Homology (PH), Coiled coil (CC), Ras-binding Domain (RBD), Dbl homology (DH), InsPx4 fosfatasa (InsPx4-PTPasa), Src homology 3 (SH), Dock homology Region (DHR).

La estructura cristalina de Rac1 fue resuelta en el año 1997 [74] y posteriormente, en el año 2000 se obtuvo la estructura de Rac1 en complejo con los dominos DH/PH del GEF Tiam1 [75]. A partir de estas estructuras, se comenzó a comprender más acerca de la interacción de GEFs de la familia Dbl y la GTPasa Rac1 y cuáles son los elementos estructurales que regulan la especificidad del reconocimiento. Finalmente se identificó al Triptofano 56 (Trp56) de Rac1 como residuo clave en el reconocimiento de algunos GEFs Rac1 específicos, tales como Tiam1, TrioN, GEFH1 [76, 77]. Más aún, cuando se realizaron mutantes puntuales sobre la estructura de Cdc42 cambiando la fenilalanina que presenta en dicha posición por un Trp, los GEFs Rac1 específicos fueron capaces de activar a Cdc42 [76, 77]. Posteriormente también se describió que DOCK180, un miembro de la

familia atípica de GEFs DOCK, utiliza al Trp56 y a la Alanina 27 como residuos clave en el reconocimiento de Rac1 [78]. En este sentido, diferentes trabajos muestran que el Trp56 de Rac1 es un residuo clave en el reconocimiento e interacción con sus GEFs específicos, ya sean de la clásica familia Dbl como de la familia atípica DOCK.

Rac1 y GEFs en cáncer

Las Rho GTPasas tienen un rol central en la regulación de diversos procesos celulares y con lo cual, su alteración o desbalance puede ser la causa molecular de diversas enfermedades, incluyendo al cáncer. Particularmente, la alteración en la actividad de Rho GTPasas en cáncer está dada por una sobreexpresión y/o por una hiperactivación, ya que raramente se encuentran mutadas. Recientemente se describió que existen mutaciones con ganancia de función en el gen de *rac1* en pacientes con melanoma provocados por exposición a radiación solar [79]. Sin embargo, este caso es una excepción hasta este momento. La alteración por sobreactivación y/o sobreexpresión de estas vías de señalización fue descripta en diferentes tipos de cáncer, como por ejemplo cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, carcinomas colorrectales, leucemias, osteosarcomas, carcinomas hepatocelulares, neuroblastomas, carcinomas de pulmón (tanto de células pequeñas como de células no-pequeñas), cáncer gástrico, glioblastomas, entre otros [80].

Las primeras evidencias funcionales que vinculan la transformación maligna con alteraciones en las vías de Rho GTPasas provienen de ensayos en los que Rac1 constitutivamente activo (ej. Rac1 G12V), y en menor medida RhoA, inducen transformación maligna en fibroblastos y tumorigenicidad en ratones atímicos, siendo además requeridos para la trasformación mediada por Ras [81, 82].

Particularmente en cáncer mamario, el aumento de los niveles de Rac1 se localiza en la membrana plasmática y no se debe a una amplificación génica sugiriendo una desregulación en la transcripción o un aumento en la estabilidad del ARN [83]. Por otro lado, tanto en cáncer mamario como en cáncer de colon se evidenció la expresión de la variante de *splicing* Rac1b, que presenta una actividad elevada mediante un intercambio de GDP por GTP acelerado [83].

Los mecanismos específicos por los cuales Rac1 influencia transformación maligna y la progresión tumoral siguen siendo objeto de estudio, sin embargo existen evidencias claras que la actividad desregulada de Rac1 resulta en la pérdida de adhesión celular a la matriz extracelular [84] y en un aumento en la capacidad invasiva de las células tumorales [85], a través de la modulación del citoesqueleto de actina y de la regulación de la transcripción de metaloproteinasas de matriz y/o de sus inhibidores [86, 87].

Si bien *rac1* no es considerado un oncogén, varios de sus activadores tipo GEF fueron aislados inicialmente como oncogenes en ensayos de transformación de fibroblastos murinos con ADN derivado de tumores humanos. Sin embargo, el mecanismo más común de sobreactivación de la vía de Rho GTPasas es la activación aberrante de los GEFs, particularmente los receptores acoplados a tirosina kinasa (RTKs) y los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) cumplen un rol central en este sentido. También se encontraron casos en donde los GEFs son sobreexpresados y en menor medida, mutaciones en donde la actividad catalítica de los GEFs se ve afectada [15].

Tiam1 (por sus siglas en inglés: <u>T</u> cell <u>i</u>nvasión <u>a</u>nd <u>m</u>etástasis 1), un GEF de la familia Dbl específico de Rac1, se encuentra asociado a la progresión de varios tipos de cáncer. Este GEF funciona como un efector río abajo de Ras y diferentes estudios muestran que Tiam1 se encuentra sobreexpresado [88-90] y/o mutado [91] en diferentes tipos tumorales. La sobreexpresión de Tiam1 le confiere un

fenotipo invasivo a células de linfoma T, sugiriendo que niveles aumentados de Tiam1 puede resultar en progresión tumoral e invasión. También se observó que la expresión de Tiam1 correlaciona con un aumento motilidad de células de carcinoma mamario humano siendo necesaria para el mantenimiento del fenotipo migratorio de estas células [92, 93].

Otro de los GEFs relevantes en el fenotipo transformado es P-Rex1 (del inglés: phosphatidilinositol-3,4,5-tris-phosphate-dependent Rac Exchange factor), un Rac1 GEF de la familia Dbl. P-Rex1 presenta niveles de expresión altos en tumores mamarios humanos con respecto a tejido normal mamario y se postula como un GEF esencial para el fenotipo transformado de células de carcinoma mamario [94]. De la misma manera, este activador está vinculado a la invasión celular en cáncer de próstata y los niveles de expresión de esta proteína correlacionan con la capacidad metastásica de líneas celulares de próstata. Muestras de pacientes con altos niveles de expresión de P-Rex1 coinciden con aquellos pacientes que presentan cáncer protático metastásico [95].

De la familia clásica de GEFs Dbl, se pueden citar otros ejemplos que presentan un rol importante en el comportamiento de células tumorales. Estudios recientes muestran que los GEFs Vav2 y Vav3 son dos reguladores claves en tumores primarios de mama así como también en la metástasis específica a pulmón [96]. La vía Rac1-Vav3 es importante para la metástasis de cáncer de próstata y la expresión de Vav3 correlaciona con la progresión de este tipo de cáncer y la recurrencia post-tratamiento [97]. Por otro lado, Vav3 junto con los GEFS Trio y Ect2 también median el comportamiento invasivo de células de glioblastoma humano [98].

Con respecto a los GEFs de la familia atípica de DOCK, también existen evidencias claras de su rol en progresión tumoral. Dock180 (también conocido

como Dock1) es un Rac1GEF que promueve la invasión de células de glioblastoma *in vitro* e *in vivo* [99]. Dock180 es una molécula clave en la progresión y metástasis de cáncer mamario mediado por HER2 [100].

De manera opuesta a lo expuesto anteriormente, las proteínas GAP podrían actuar como supresores tumorales. Actualmente todavía se cuenta con escasa información acerca de este tema. Sin embargo, se describió el rol del p190RhoGAP en la inhibición de la iniciación de gliomas en modelos murinos [101]. Por otro lado, se describió la capacidad de β2-quimerina, un RacGAP, de inhibir la proliferación y migración celular de células de carcinoma mamario murino, incidiendo en un marcada disminución de la invasión y metástasis tumoral *in vivo* [102].

Rho GTPasas como blancos moleculares

Considerar a la vía de Rho GTPasas como blanco terapéutico es muy atractivo debido al papel que juega esta vía en el establecimiento y progresión tumoral. Diferentes toxinas bacterianas tienen como blanco molecular a vías de señalización asociadas a Rho GTPasas, mostrando la posibilidad de modular dicha vía se señalización. La exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, así como otras exoenzimas con actividad transferasa sintetizadas por *Costridium limosum*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, inducen la ADP-ribosilación de RhoA, RhoB y RhoC. Este proceso no afecta la unión de las GTPasas a sus efectores ni a la actividad GAP, sino que impide la interacción con los GEFs y bloquea la disociación de GDIs, acumulándose en el citosol la forma inactiva de la GTPasa. También se encontraron toxinas producidas por *Clostridium spp*. que dan lugar a la glicosilación de residuos claves en Rho y Rac1, impidiendo su interacción con efectores, bloqueando la actividad GTPasa e inhibiendo el intercambio de nucleótidos por GEFs, logrando que estas GTPasas glicosiladas se comporten como dominantes negativos [103].

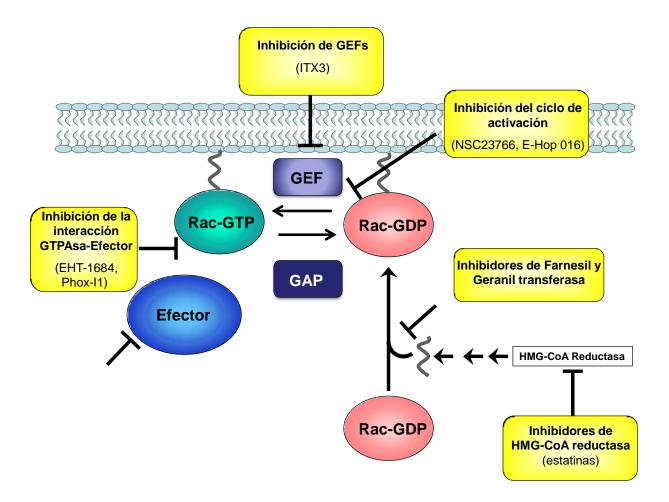


Figura 9 Estrategias utilizadas la inhibición de la vía de Rac1. Las estrategias utilizadas implican la inhibición de anclaje a membrana, la inhibición de la activación de la GTPasa, la inhibición de los GEFs, la inhibición de la interacción de Rac1 con sus efectores o directamente la inhibición del efector.

Por otro lado, también se conoce a la Brefeldina A, un producto natural aislado del hongo *Eupenicillium brefeldianum*, que tiene actividad inhibitoria sobre ArfGEF [15].

Varias estrategias famacológicas fueron utilizadas con el objetivo de modular la vía de señalización de la GTPasa Rac1 como blanco molecular, tal como se observa en la *Figura 9*. Una estrategia muy estudiada es la inhibición de la isoprenilación del C-terminal de esta GTPasas, utilizando inhibidores de diferentes enzimas de la ruta biosintética de estas estructuras lipídicas: inhibidores de HMGCoA reductasa (estatinas) [104] e inhibidores de farnesil- y geranilgeranilo transferasa [105]. Sin embargo, esta estrategia no es específica, ya que afecta a todas aquellas proteínas que presentan esta modificación post-traduccional de anclaje a membrana. También se reportó que bajas concentraciones de 6-tio-GTP generado a partir de azatioprina inhibe los niveles de activación de Rac1 en linfocitos T y en células de carcinoma mamario. Esta estrategia tampoco parece ser específica, especialmente a altas concentraciones [106-108].

Se desarrollaron adicionalmente estrategias más específicas para inhibir la vía GEF-Rac1-Efector. En este sentido, se conocen inhibidores de la activación de Rac1 como NSC23766 [109] y algunos análogos como EHop-016 [110-112], compuestos que inhiben la actividad de algunos GEFs [113-115], compuestos que desplazan el nucléotido de guanina como EHT 1864 [116], inhibidores que modulan la interacción de Rac1 con sus efectores como Phox-I1 [117] y moléculas que inhiben directamente a efectores de Rac1 como el inhibidor de Pak PF-3758309 [118].

Ensayos in silico

Screening virtual

En este trabajo se utilizó la metodología de docking para realizar el screening virtual. El docking se basa en la predicción de la conformación y orientación de las diferentes moléculas sobre el sitio blanco. Los algoritmos de docking "posan" los compuestos en este sitio, considerando todas las posibles conformaciones y luego se puntúan las posibles interacciones entre las moléculas y el blanco con el objetivo de predecir su actividad. En este caso, se utilizó la estructura cristalizada del complejo Rac1-Tiam1, del cual se separó la estructura de Rac1 obtenida del Protein Data Bank (PDB ID código 1MH1) como blanco molecular para llevar adelante el screening, seleccionando la superficie de Rac1 que contiene el Trp56 como blanco específico. Se utilizó la base de datos ZINC, la cual es de público acceso y presenta la ventaja de la disponibilidad comercial de todas las moléculas presentes en la base [119, 120]. Por otro lado, esta base cuenta con una serie de filtros establecidos y con las estructuras 3D listas para ser utilizadas en un ensayo de docking. Se seleccionaron aproximadamente 200.000 compuestos de la base de datos para realizar la búsqueda, del subgrupo tipo-droga (drug-like subset). Se utilizó el software eHits (SymBioSys Inc)[121] para llevar adelante el screening, ya que es un software que se caracteriza por contener algoritmos novedosos que permiten realizar los cálculos de manera veloz.

Ensayos in vitro

Compuestos

El inhibidor de Rac1 existente NSC23766 fue adquirido de Calbiochem, EE.UU.

Inicialmente los compuestos fueron adquiridos de diferentes vendedores: Hit11, Hit7, Hit20, Hit12, Hit35 (Enamine, Rusia); Hit29 (Life Chemicals, EE.UU); Hit19, Hit28, Hit53 (ChemicalBlock, EE.UU); Hit31, ZINC69391 (Chembridge, EE.UU). En todos los casos, se prepararon soluciones stock 20 mM final o 40 mM final en DMSO, con el objetivo de evitar concentraciones mayores a 0.5% de DMSO en los ensayos *in vitro*.

Posteriormente, la síntesis de ZINC69391 y el análogo 1A-116 para la caracterización *in vitro* y los ensayos *in vivo* estuvo a cargo de la Dra. María Julieta Comin, del Centro de Investigación y Desarrollo en Química del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

Líneas celulares y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizaron diferentes líneas celulares que se detallan a continuación. Todas las células utilizadas fueron subcultivadas aproximadamente tres veces por semana, usando una solución de disociación enzimática de tripsina-EDTA (Gibco BRL). La viabilidad celular fue evaluada usando la técnica de exclusión con el colorante vital azul tripán.

HEK-293T. Esta línea fue gentilmente cedida por la Dra. Natalia Fernandez del Laboratorio de Farmacología de Receptores, FFyB, Universidad de Buenos Aires. Esta línea celular fue establecida de células embrionarias humanas de riñon y es una línea que permite ser tranfectada con altos rendimientos. La misma, expresa constitutivamente el antígeno T del virus SV40. Las células HEK-293T son adherentes y crecen formando parches. Las monocapas son mantenidas *in vitro* en medio de cultivo Dulbeco´s Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, California,

Estados Unidos) en presencia de 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA, Pasching, Austria) inactivado por calor y 80 μg/ml de gentamicina.

F3II. Esta línea celular de carcinoma mamario murino es una variante sarcomatoide altamente agresiva y metastásica establecida a partir de una subpoblación clonal de un tumor espontáneo hormono-independiente originado en un ratón BALB/c [122]. Las células F3II crecen *in vitro* adheridas al sustrato hasta formar una monocapa confluente. Esta línea es mantenida en cultivos en monocapa en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor y 80 μg/ml de gentamicina. En ensayos *in vivo*, F3II forma tumores altamente invasivos localmente de manera similar en hembras y machos en ratones BALB/C.

MDA-MB-231. La línea celular MDA-MB-231 fue adquirida de ATCC (#HTB-26).Esta línea celular fue establecida a partir de una efusión pleural de un adenocarcinoma mamario humano en una paciente de 51 años. La misma presenta células epiteliales adherentes que expresan el receptor de EGF, pero no presentan receptor de estrógeno, por lo tanto son hormono independientes y es considerada como una línea celular altamente agresiva. Esta línea es mantenida en cultivos en monocapa en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor y 80 μg/ml de gentamicina. En ensayos *in vivo*, MDA-MB-231 forma adenocarcinomas poco diferenciados (grado III) en ratones nude.

MCF7. La línea celular MCF7 fue adquirida de ATCC (#HTB-22). Esta línea fue establecida a partir de una efusión pleural de un adenocarcinoma mamario humano de una paciente de 69 años. A diferencia de la línea MDA-MB-231, mantiene ciertas características de un epitelio mamario diferenciado, tal como la expresión y la capacidad de respuesta del receptor de estrógeno. Esta línea está compuesta por células epiteliales que crecen en monocapa y se mantienen con

medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor y 80 μ g/ml de gentamicina.

LN229. La línea celular LN229 fue adquirida de ATCC (#CRL-2611). Esta línea fue establecida en 1979 de células pertenecientes a una paciente de 60 años con un glioblastoma derecho frontal parieto-occipital (astrocitoma grado IV). Son células adherentes que presentan a nivel genómico: p53 mutado, PTEN wild type y deleciones en p16, p14^{ARF} [123]. En ensayos in vivo, son tumorigenicas en tumores nude. Esta línea es mantenida en cultivos en monocapa en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor y 80 μg/ml de gentamicina.

U87-MG. La línea celular U87-MG fue adquirida de ATCC (#HTB-14). Esta línea fue establecida de células de una paciente de 44 años con un glioblastoma (astocitoma grado IV). Estas células presentan p53 (wild type), PTEN mutado y deleciones en p16 y p14^{ARF} [123]. En ensayos in vivo esta línea es tumorigénica. U87-MG es mantenida en cultivos en monocapa en medio de cultivo MEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor y 80 μg/ml de gentamicina.

Ensayos de proliferación celular y determinación del IC₅₀

Ensayos de proliferación. Se sembraron 2x10⁴ células en placas de 96 wells y luego se trataron en medio completo durante 72 hs. El crecimiento celular fue medido con el ensayo colorimétrico de MTT (5 mg/ml de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich), el cual indica la actividad metabólica celular. La concentración que provocó la inhibición del 50 % (IC₅₀) se determinó utilizando la función de regresión no linear del GraphPad Prism5[®].

Proliferación celular de células MDA-MB-231 sobreexpresando Rac1-G12V. Células MDA-MB-231 fueron transfectadas utilizando Lipofectanima 2000 (Life

Technologies) con la construcción Rac1-G12V (cdna.org) o el vector vacio (pcDNA3) de acuerdo al proveedor. Esta construcción fue previamente descripta [124]. 2x10⁴ células transfectadas fueron sembradas y tratadas con diferentes concentraciones de 1A-116 por 48 hs. La proliferación celular fue medida utilizando el ensayo de MTT.

Proliferación celular de células LN229 silenciadas. En el día 0, se transfectaron células LN229 utilizando RNAi Rac1 o RNAi control utilizando Lipofectamina 2000 (Life Techonologies) siguiendo indicaciones del proveedor. En el día 4, se llevó una segunda ronda de transfección bajo las mismas condiciones. A los 7 días 2.5x104 células fueron sembradas y tratadas con diferentes concentraciones de 1A-116 por 72 hs. La proliferación celular fue medida utilizando el ensayo de MTT. Las secuencias de los RNAi anti-Rac1 son: sense 5′- GUU CUU AAU UUG CUU UUC CTT-3′, antisense 3′-TTC AAG AAU UAA ACG AAA AGG-5′ descriptos anteriormente [125]; para el RNAi control, sense 5′-CAG UCA GGA GGA UCC AAA GTT-3′, antisense 3′-TTG UCA GUC CUC CUA GGU UUC-5′ descriptos anteriormente [126]. Los oligonucleótidos sintéticos fueron preparados por Life Technologies.

Anticuerpos

En este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos: monoclonal anti-Rac1 (Sigma-Aldrich), monoclonal anti Cdc42 (Santa Cruz Biotechnologies), monoclonal anti-HA (Millipore), policlonal anti P-Rex1 (Abcam), monoclonal anti-Dock180 (Santa Cruz Biotechnologies), policlonal anti-Pak1 (Millipore), monoclonal anti-fosfoPak1 (Millipore).

Ensayos de pull down

Los niveles de Rac1 y Cdc42 activos fueron determinados utilizando el ensayo de pull down, el cual se basa en la unión de la conformación de la GTPasa activa al dominio p21 de la proteína efectora Pak1 [127].

Las células se sembraron en placas de cultivo celular de 6 wells. Se llevaron adelante dos diseños experimentales diferentes. En el primer caso, en donde se evaluó la activación de la vía con EGF, las células fueron hambreadas (medio de cultivo sin SFB), luego incubadas por 1 hora con los compuestos y posteriormente estimuladas con EGF (Life Techonologies) 100ng/ml por 15 minutos. En el segundo diseño experimental, las células fueron incubadas en presencia de los compuestos en medio completo, es decir, medio de cultivo con 10% SFB. Luego, las células fueron lavadas con PBS a 4°C sobre hielo y lisadas en el buffer 150-GPLB (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 5 mM MgCl₂; 150 mM NaCl; 0.5% NP-40; 5mM β-glicerofosfato; 10% glicerol, pH 7.4) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). Los lisados fueron clarificados (14.000 rpm, 10 min, 4°C) y las concentraciones de proteína fueron normalizadas. Se separó una alícuota para la determinación de proteína total y el resto fue incubado con microesferas de glutatión-sefarosa 4B (GE Healthcare) acopladas con la proteína de fusión GST-Pak expresada en bacterias E. coli. Los complejos fueron lavados con buffer de lisis, resuspendidos en sample buffer, hervidos por 10 minutos y separados en un SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare) para luego ser marcadas con anticuerpos específicos.

Precipitación de afinidad Rac1-GEF

Para la precipitación de Rac1-Tiam1, células HEK-293T creciendo en fase log fueron transfectadas utilizando FuGENE HD (Roche Applied Science) con una

construcción Tiam1-C1199 con un epítope HA gentilmente cedido por Dr. Alfredo Cáceres (INIMEC-CONICET, Córdoba). Esta construcción fue descripta anteriormente [124, 128, 129] y tiene como característica principal una mayor estabilidad que la construcción de tamaño completo. Las células transfectadas fueron lisadas en buffer de MgCl₂ (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1% NP-40; 10% glicerol) suplementado con un cocktail de inhibidores de protesas (Sigma).

Para la precipitación de afinidad de Rac1-P-Rex1 se utilizaron células MCF7 que presentan niveles altos de expresión endógenos de P-Rex1 [94]. La precipitación de afinidad de Rac1-Dock180 se utilizaron células LN229 que expresan altos niveles endógenos de Dock180 [99]. En ambos casos, las células fueron lisadas en Buffer EDTA (25 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 NaCl; 5 mM EDTA; 0.5% NP-40; 5 mM β-glicerofosfato) suplementado con cocktail de inhibidor de proteasas (Sigma).

En todos los casos, los lisados celulares fueron clarificados y cuantificados. Microesferas de glutatión sefarosa 4B (GE Healthcare) acopladas con la proteína de fusión GST-Rac1 expresada en bacterias *E. coli* fueron preincubadas con diferentes concentraciones de los compuestos por 15 o 30 min a 4°C con agitación constante. Posteriormente, se agrega 300 a 400 µg de proteína total de los lisados clarificados en presencia o ausencia de los compuestos y se incuban 1 h a 4°C con agitación constante. Las microsferas fueron lavadas dos veces en el correspondiente buffer de lisis, resuspendidas en el simple buffer y hervidas por 10 min. Cabe aclarar que la integridad de las proteínas de fusión utilizadas fue checkeada con un SDS-PAGE y posterior tinción con Coomasie Blue antes de ser utilizadas en este ensayo.

Ensayos de ciclo celular por citometría de flujo

Para los ensayos de ciclo celular con MDA-MB-231 y LN229, las células fueron sincronizadas mediante hambreado (medio de cultivo en ausencia de SFB) durante 48 hs. Posteriormente, se trataron las células por 24 hs con diferentes concentraciones de ZINC69391 en presencia de SFB. Las células fueron colectadas por tripsinización, fijadas en 70% metanol en PBS y teñidas con ioduro de propidio 1 mg/ml (Life Technologies). La progresión del ciclo celular fue analizada utilizando un citómetro de flujo BD FACSCalibur ™ (BD Biosciences). Se verificó la función de discriminación de dobletes del citómetro con el kit DNA QC Particles (BD Biosciences) antes de realizar los análisis detallados en el trabajo.

Tinción del citoesqueleto de actina

Se sembraron células sobre cubreobjetos esféricos de vidrio (Fisher Scientific, EE.UU) que fueron fueron hambreadas por 16 h en (medio de cultivo sin SFB). Luego, fueron incubadas con diferentes concentraciones de ZINC69391 por 1 hora y estimuladas con el EGF (100 ng/ml) (Life Technologies) durante 15 min. Las células fueron posteriormente fijadas e incubadas con una solución de faloidina conjugada a AlexaFluor 555 (Molecular Probes, Life Tecnologies, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se montaron con Vectashield-Dapi (Vector Labs) sobre portaobjetos de vidrio. Las células fueron observadas utilizando un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse T2000 a un aumento 1000X y las imágenes se obtuvieron con cámara incorporada al mismo miscroscopio. Se realizaron 3 experimentos independientes en cada caso.

Migración celular

Ensayos de herida en monocapa. Se realizaron "heridas" en monocapas confluentes de células MDA-MB-231 y F3II en placas de 6 wells utilizando un tip estéril de p200. Las monocapas fueron lavadas extensivamente con PBS y luego incubadas por 16 hs en DMEM con 10% SFB en presencia o ausencia de ZINC69391. Las células fueron fijadas y teñidas con azul de metileno. Se obtuvieron 10 fotografias de cada well y se cuantificó el área invadida utilizando el software NISElements 3.0 (Nikon). El cierre de la herida se normalizó al área máxima de herida.

Ensayos de transwell. 1 x 10⁵ Células LN229 hambreadas por 16 h fueron preincubadas por 30 minutos con diferentes concentraciones del compuesto o en ausencia del mismo y luego sembradas en la parte superior del transwell con poro 8 μm (Nunc, GBO) en placas de 24 wells. En la parte inferior, en el well propiamente dicho, se agregó DMEM con 10% de SFB como quimioatractante. Luego de una incubación de 16 hs, las células que no migraron (en la parte superior de la membrana) fueron removidas utilizando un hisopo, mientras que las células que efectivamente migraron (la parte inferior de la membrana) fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Se contaron las células que migraron en cinco campos de cada well. Este experimento se repitió 3 veces de manera independiente en cada caso.

Invasión celular

Se utilizaron cámaras *transwell* para realizar este ensayo. Las mismas fueron recubiertas con un coating de 100 µl de una suspensión de Matrigel™ (BD Biosciences) 0.8mg/ml y secadas a temperatura de ambiente. El Matrigel™ es una preparacón de membrana basal extraido del sarcoma murino de Engelbreth-Holm-Swarm, un tumor rico en proteínas de matriz extracelular. Este material contiene

aproximadamente un 60% de laminina, 30% de colágeno IV y algunos otras moléculas como proteoglicanos de heparan sulfato, EGF, factor de crecimiento tipo insulina, factor de crecimiento de fibroblastos, activadores de plasminógeno tisulares, entre otros. En estos *transwell* recubiertos fueron sembradas 1.5 x 10⁵ células LN229 y se incubaron por 48 hs. El experimento se desarrolló de la misma manera que el ensayo de migración celular por *transwell* antes descripto.

Determinación de Apoptosis

Apoptosis medido por AnexinaV. Esta determinación temprana de la apoptosis se realizó utiliznado el kit AnnexinaV-Alexa488/Cell death apoptosis (Molecular Probes, Life Technologies). Se sembraron células en cubreobjetos circulares de vidrio en una placa de 24 wells y las células fueron tratadas por 6 h con diferentes concentraciones de ZINC69391. Estas células fueron suavemente fijadas y teñidas con AnnexinaV-Alexa488. Inmediatamente se observaron en un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE2000.

Apoptosis determinado por TUNEL. Se utilizó el kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL system para determinar el efecto proapoptotico de ZINC69391. Se siguieron las instrucciones del proveedor para células adherentes. Brevemente, las células fueron sembradas en cubreobjetos circulares de vidrio, tratadas con diferentes concentraciones de ZINC69391 por 6 hs y luego fijadas con paraformaldehido. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas e incubadas con una mezcla de reacción que contenía: buffer de reacción, nucleótidos (conteniendo fluoresceína-12-dUTP) y transferasa terminal recombinante durante 1 h. Posteriormente, se realizaron lavados y las células fueron montadas con Vectashield-Dapi (Vector Labs)

sobre portaobjetos de vidrio. Inmediatamente las células fueron observadas en un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000.

Ensayos in vivo

Se utilizaron hembras de la cepa BALB/c para el modelo de carcinoma mamario F3II. Adicionalmente, también se utilizaron ratones atímicos de la cepa nude (nu/nu) BALB/c para el modelo xenogénico de glioblastoma LN229. Los ratones utilizados en este trabajo tenían una edad aproximada de 8-10 semanas de edad y un peso de entre 20 y 25 g. Fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Veterinaria de La Plata y mantenidos en condiciones estándar en cajas con libre acceso al agua y alimento. Los animales nude fueron alojados en un aislador específicamente diseñados para animales inmunocomprometidos. Toda la manipulación de estos animales se llevó a cabo en un flujo laminar.

Ensayos de toxicidad aguda en ratones

Se llevaron a cabo ensayos de toxicidad aguda con ambos compuestos en el Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, de la Universidad Nacional del Litoral – CONICET dirigido por el Dr. Hugo Ortega. Cada protocolo consistió en la administración de diferentes dosis de cada compuesto a ratones y la posterior observación de signos. Luego, los animales fueron sacrificados, se les realizó la necropsia correspondientes y análisis hematológicos y sanguíneos.

Metástasis experimental en un modelo murino singénico de cáncer mamario F3II

Se inocularon 2x10⁵ células F3II viables en 0.3 ml de DMEM en la vena lateral de la cola de ratones BALB/c. Posteriormente, los animales fueron administrados diariamente via i.p con 25 mg/kg de ZINC69391 o 3 mg/kg 1A-116. Este tratamiento se llevó a cabo por 3 semanas y en el día 21 los animales fueron sacrificados. Se removieron los pulmones, se fijaron y tiñeron con la solución de Bouin y luego las metástasis superficiales fueron contabilizadas utilizando una lupa de disección.

Progresión tumoral en un modelo murino singénico de cáncer mamario F3II

Los animales fueron inoculados por vía subcutánea con $2x10^5$ células viables F3II en 200 μ l de DMEM sin SFB en el flanco derecho. Al día siguiente de la inoculación, se separaron los animales al azar en diferentes grupos (n=5) se comenzó con un tratamiento diario i.p de ZINC69391, 1A-116 o el vehículo. La formación de tumores fue monitoreada mediante palpación periódica y el tamaño tumoral fue medido con un calibre electrónico dos veces por semana. El diámetro tumoral fue calculado utilizando la fórmula: ν (ancho x largo) y el volumen tumoral fue determinado mediante la fórmula ν (ancho x largo). Los animales fueron sacrificados al final del protocolo por dislocación.

Determinación de la sobrevida en un modelo xenogénico ortotópico de glioma LN229

Para establecer este modelo, se anestesiaron los animales con ketamina/xilacina y sus cabezas fueron inmovilizadas en un marco estereostático en el interior de una cabina de seguridad biológica. En primer lugar se colocó solución fisiológica en los ojos para mantener la humedad adecuada durante el procedimiento. Con un bisturí esteril se realizó una incisión sagital sobre el hueso parieto-occipital de aproximadamente 1 cm de largo. La superficie del cráneo

expuesta se limpió con un algodón con una solución de peróxido de hidrógeno, permitiendo la visualización del bregma. Posteriormente, se perforó el cráneo 2.3 mm a la derecha y 0.1 mm posterior a bregma. Una jeringa Hamilton de 10 µl con una aguja 33G se utilizó para descender 3mm a través del cráneo. Luego, se retiró 0.4 mm para generar un "bolsillo" para la implantación de las células. Se inyectaron 2 μl de una suspensión conteniendo 2x10⁵ de células LN229 en DMEM en el lapso de 3 minutos. La jeringa fue mantenida en el lugar durante 3 minutos después de la inyección, con el objetivo de minimizar el reflujo. A continuación, se limpió la superficie del cráneo y se cerró el cuero cabelludo con pegamento. Se administró ibuprofeno via s.c para el alivio post-operatorio y ampicilina para evitar infecciones. Terminada la cirugía, los animales permanecieron en sus jaulas para su recuperación post-operatoria. En el día 6 post-cirugía, se separaron los animales de manera aleatoria en dos grupos y luego se comenzó con el tratamiento diario vis i.p de ZINC69391 20 mg/kg o vehículo para el grupo control. Los animales fueron monitoreados diariamente y aquellos que mostraron compromiso neurológico significativo, fueron sacrificados. Los cerebros fueron extraídos, fijados en paraformaldehído y embebidos en parafina.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPadPrism Sorftware, La Jolla, CA, EE.UU). Los test estadíticos utilizados en este trabajo fueron: t Test o test U de Mann-Whitney para comparar variables cuantitativas paramétricas y no paramétricas, respectivamente; ANOVA de simple vía o doble vía para comparar más de dos grupos de variables cuantitativas paramétricas. Se utilizó ANOVA de doble vía cuando se tomaron dos variables en consideración. Los test que se utilizaron posteriormente fueron Tukey y Dunnett.

Para determinar el uso de test paramétricos o no paramétricos se evaluó la normalidad y la homogeneidad de varianzas.

Para el análisis de la progresión tumoral se realizó una regresión lineal para evaluar diferencias entre las tasas de crecimiento y posteriormente un ANOVA a tiempo final para comparar volúmenes tumorales. El análisis de sobrevida se realizó mediante un gráfico de Kaplan-Meyer y el test estadístico utilizado para comparar las curvas fue Log-Rank Mantel Cox.

En todos los casos se consideraron estadísticamente significativo los P valores menores a 0.05.

Búsqueda de nuevos agentes antitumorales utilizando una estrategia de screening virtual basado en docking

Selección y validación del blanco

Con el objetivo de diseñar nuevas drogas con propiedades antitumorales, se llevó adelante un proyecto de desarrollo de drogas con blancos moleculares específicos. En los últimos años se ha acumulado mucha información acerca de la participación de distintos integrantes de la familia de las Rho-GTPasas en procesos celulares asociados a la transformación maligna [130]. Particularmente, en nuestro laboratorio se ha estudiado previamente en detalle el papel de la GTPasa Rac1 en los mecanismos moleculares relacionados con la invasión y metástasis tumoral. Tomando como modelo un carcinoma mamario murino altamente invasivo y metastático con niveles de expresión de Rac1 elevados, se transfectó de manera estable el dominio activo de β2-quimerina. Esta proteína actúa como inhibidor específico de la actividad de Rac1, es decir como una proteína GAP. La sobreexpresión heteróloga de esta proteína resultó en un marcado descenso de la proliferación y migración celular, lo cual incidió en un marcada disminución de la invasión y metástasis tumoral *in vivo* [102].

Asimismo, existen vastas evidencias en bibliografía de la relevancia biológica que presenta la GTPasa Rac1 en el desarrollo de diferentes tipos tumorales, tanto en modelos *in vitro* e *in vivo* como en pacientes [63]. Es por ello que es posible prever un alto efecto antitumoral en drogas que logren inhibir de forma específica la actividad de Rac1. Otro de los aspectos interesantes del blanco es que la GTPasa Rac1 no es considerada una oncoproteína, apelando a la estrategia de adicción no

oncogénica desarrollada en la introducción. En conclusión, la GTPasa Rac1 se consolida como un blanco validado para el diseño de nuevas drogas antitumorales.

Una vez seleccionado el blanco, cabe preguntarse acerca la drogabilidad del mismo. Son interesantes los datos que aportan en este sentido los inhibidores naturales provenientes de bacterias y hongos que presentan como blanco molecular la vía de las Rho GTPasas, sugiriendo la "drogabilidad" de esta vía. Si bien las GTPasas se unen a un nucleótido de guanina para su función celular, el diseño de análogos de GTP inspirados en la estrategia utilizada para diferentes tirosinaquinasas es impracticable en este contexto. El motivo principal es que dada las concentraciones intracelulares de GTP-GDP (niveles milimolares) y la alta afinidad del GTP (nivel picomolar bajo) por el sitio de unión a la GTPasa se concluye que este sitio catalítico de unión a nucleótidos de guanosina es "no drogable". Por este motivo, se estableció una estrategia diferente, basada en la inhibición de la activación de Rac1. Para ello, se utilizó como blanco molecular específico el residuo Trp56 de Rac1, el cual es clave para la interacción de la GTPasa con diferentes activadores tipo GEF tanto de la familia Dbl como de la familia DOCK. Es decir, que se ideó una estrategia de inhibición de una interacción proteína-proteína buscando agentes que interfieran estéricamente la unión Rac1-GEF, bucando bloquear la activación de Rac1 mediada por GEFs.

Generación de Hits: Screening virtual basado en docking

A partir del blanco elegido, se desarrolló una estrategia *in silico* basada en el blanco para el diseño de nuevos inhibidores. Para ello, se cuenta con la estructura cristalográfica de Rac1 interactuando con los dominios DH-PH del GEF Tiam1 [75] y la misma se encuentra disponible en Protein Data Bank. Por otro lado se eligió la base de datos ZINC [46, 119], una base libre que contiene diferentes compuestos

disponibles comercialmente. Esta base provee formatos 3D listos para ser utilizados en estrategias de *docking*.

Utilizando la estructura cristalográfica de Rac1 y un subset de 200.000 moléculas tipo "drug-like" de la base de datos ZINC, se llevó adelante el *screening* virtual basado en *docking* utilizando el software eHits [121].

El resultado de dicha búsqueda fue una lista ordenada de Hits con posible afinidad por la zona de la superficie de Rac1 que contiene al residuo Trp56. Teniendo en cuenta los *scores* obtenidos y luego de realizar una selección visual de los compuestos, se adquirieron 11 compuestos para ser ensayados *in vitro* que se muestran en la tabla I. Las estructuras de dichos compuestos se observan en la Figura I.1

Tabla I. Hits obtenidos a partir del screening virtual basado en docking

Nro en el ranking	Nombre	Score	PM
1	Hit 1 (ZINC69391)	-5.860	310.303
7	Hit 7 (ZINC04619834)	-4.662	301.202
11	Hit 11 (ZINC05185988)	-4.690	377.488
12	Hit 12	-4.0	326.7
	(ZINC055839579)		
19	Hit 19 (ZINC04943006)	-4.466	242.184
20	Hit 20 (ZINC05213424)	-4.466	322.796
28	Hit 28 (ZINC04626568)	-4.226	316.286
29	Hit 29 (ZINC05155057)	-4.601	253.205
31	Hit 31 (ZINC04802371)	-4.301	254.648
35	Hit 35 (ZINC06352079)	-4.228	303.774
53	Hit 53 (ZINC04686339)	-4.070	213.142

Figura I.1 | Moléculas adquiridas para su selección *in vitro*. De los resultados de *screening* virtual basado en *docking,* se seleccionaron visualmente y se adquirieron comercialmente 11 pequeñas moléculas de los primeros 100 hits obtenidos.

Screening in vitro de posibles inhibidores de Rac1

Con el objetivo de evaluar el efecto antitumoral *in vitro* de los compuestos seleccionados, se realizaron ensayos de proliferación celular utilizando los 11 compuestos seleccionados. Dichos ensayos se realizaron en diferentes líneas celulares, donde el rol de Rac1 es relevante tales como carcinoma mamario murino y glioblastoma multiforme. Estos mismos ensayos se realizaron también en una línea de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (resultados previamente mostrados).

En esta selección inicial, las células fueron tratadas a concentración fija de $200~\mu\text{M}$ durante 72 hs y la proliferación celular fue cuantificada utilizando el ensayo metabólico de MTT.

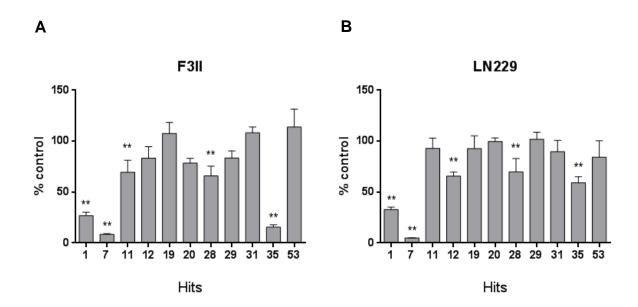


Figura I.2|Screening inicial *in vitro* – Efecto antiproliferativo. Ensayo de proliferación celular sobre células F3II (A) y LN229 (B), realizando tratamientos de los diferentes hits por 72 h con concentración fija de 200 μ M. **, p<0.01 vs. Control. ANOVA cont. con el test de comparación múltiple de Dunnett´s.

Tal como se observa en la *Figura I.2,* los Hits que presentaron una inhibición significativa de la proliferación fueron Hit1, Hit7, Hit28 y Hit35. Si bien, se observan casos en los que algunos Hits tienen efecto sobre algunas líneas, los Hits antes mencionados son lo que mostraron efecto en todas las líneas celulares ensayadas.

A continuación se evaluaron diferentes concentraciones de los cuatro Hits seleccionados y se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) en las diferentes líneas celulares. En la Tabla II se muestran dichos valores.

Tabla II. Valores de IC50 para los cuatro hits seleccionados en las dos líneas celulares propuestas

Compuesto	F3II (μM)	LN229 (μM)
Hit1 (ZINC69391)	61	60
Hit7 (ZINC04619834)	80	100
Hit28 (ZINC04626568)	>200	>200
Hit35(ZINC06352079)	160	140

Selección del Hit1(ZINC69391) como inhibidor de la activación de Rac1

Con el fin de determinar el efecto de los cuatro compuestos seleccionados anteriormente sobre los niveles de activación de Rac1, se llevó a cabo un ensayo de *pull down*. Para ello, se utilizaron lisados celulares de células F3II tratadas por 12 h con los diferentes compuestos y se capturó la versión Rac1-GTP utilizando la proteína de fusión GST-Pak unida a microesferas de agarosa. Posteriormente, se realizó un western blot con los lisados capturados y el lisado total, utilizando un anticuerpo monoclonal anti Rac1 para revelar el ensayo. Este resultado fue mostrado anteriormente, y tal como se observa en la *Figura I.3*, el Hit1(ZINC69391)

fue capaz de disminuir los niveles intracelulares de Rac1-GTP, mientras que el resto de los compuestos afectaron una menor medida los niveles de activación de Rac1. Por este motivo, se seleccionó al Hit1(ZINC69391) para seguir adelante con su validación y caracterización como inhibidor de Rac1.

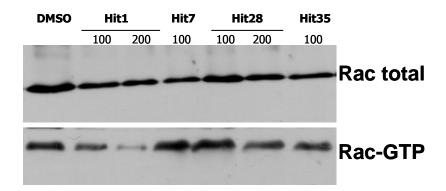


Figura I.3|Screening inicial *in vitro* – **Rac1-GTP pull down.** Lisados de células F3II tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos fueron capturadas con GST-Pak. Se muestran los niveles de Rac1 activo y Rac1 totales.

Estudios in silico de interacción del Hit1(ZINC69391) y Rac1

Una vez seleccionado al Hit1(ZINC69391), se llevaron a cabo estudios de docking más detallados utilizando el programa AutoDock4. Analizando las interacciones proteína-droga (Figura I.4), se puede observar que se establecen varias uniones puente de hidrógeno entre los átomos de nitrógeno de la guanidina y los residuos Asp57 y Ser71. Se observa particularmente, que existen interacciones de pi-stacking entre el anillo aromático metilado del compuesto y el anillo aromático del Trp56.

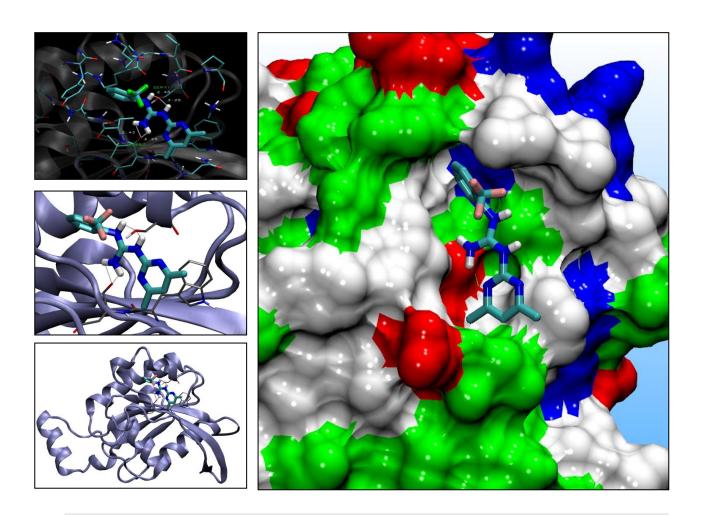


Figura I.4 | Modelado de la superficie de unión de Rac1 con el Hit1(ZINC69391). Utilizando el software AutoDock4 se predice la unión del compuesto con la superficie de Rac1 que contiene al residuo clave Trp56.

Conclusiones – Capítulo I

- Se llevó a cabo un *screening* virtual basado en *docking* utilizando la estructura cristalizada de Rac1 con el residuo Trp56 como blanco molecular
- Se obtuvo una lista de compuestos con actividad predicha sobre el blanco.
- Se evaluaron 11 compuestos in vitro y se identificaron cuatro compuestos con actividad antiproliferativa sobre células de carcinoma mamario murino y glioblastoma humano.
- El Hit1 (ZINC69391) mostró tener actividad sobre la activación de Rac1, reduciendo marcadamente los niveles de Rac1-GTP.

Desarrollo de nuevos inhibidores de Rac1 en modelos de cáncer mamario agresivo

Vastas evidencias muestran que Rac1 se encuentra sobreexpresada y/o sobreactivada en diferentes tipos tumorales, incluyendo cáncer mamario, colorrectal, testicular, pulmonar y cerebral [63, 131, 132]. Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la desregulación de Rac1 contribuye a la transformación maligna y progresión tumoral. Más aún, las funciones regulatorias de Rac1 en la reorganización del citoesqueleto de actina influencia procesos claves en células tumorales como son: migración, invasión y metástasis tumoral [133].

En pacientes con cáncer mamario agresivo, se observó que Rac1 se encuentra sobreactivada, mientras que ensayos *in vivo* muestran que Rac1 se sobreexpresa en momentos tempranos de la transformación maligna en modelos tumorales mamarios [83]. Es interesante resaltar, que algunos estudios muestran que la expresión de Rac1 es mayor en células tumorales que en el tejido mamario circundante, presentando una oportunidad terapéutica interesante [111, 134].

La mortalidad del cáncer mamario está fuertemente relacionada con la habilidad de las células tumorales de invadir y generar metástasis. La invasión y metástasis tumoral implica la adhesión a la membrana basal, secreción de enzimas proteolíticas y migración de las células dentro de los vasos sanguíneos o linfáticos, seguido por la extravasación en sitios distantes del tumor primario. En varios de estos pasos Rac1 cumple un rol regulador fundamental [63], es por ello se seleccionó el modelo de cáncer mamario agresivo para evaluar la capacidad antitumoral del compuesto Hit1(ZINC69391), a partir de ahora denominado ZINC69391.

Determinación del efecto de ZINC69391 sobre la interacción de Rac1-Tiam1

Con el objetivo de determinar si el compuesto ZINC69391 efectivamente es capaz de interferir la interacción de Rac1 con sus activadores tipo GEF, se llevó a cabo una precipitación de afinidad utilizando lisados celulares de células HEK293T sobreexpresando un versión constitutivamente activa del GEF Tiam1, denominada Tiam1-C1199. Esta variante truncada en el dominio amino-terminal fue caracterizada previamente [124]. La misma es capaz de activar efectivamente a Rac1, se expresa más establemente y parece ser más activa que la proteína completa. Se evaluó la capacidad de Tiam1-C1199 de unirse a la proteína Rac1 inmovilizadas en microesferas de glutatión-agarosa en presencia o ausencia de ZINC69391.

Los resultados demuestran que Tiam1-C1199 efectivamente es capaz de interaccionar con Rac1, tal como se muestra en el control, pero en presencia de ZINC69391 esta interacción se ve disminuida. La inhibición de la interacción ocurre de manera concentración-dependiente, logrando una disminución significativa a la concentración de 100 µM (*Figura II-1A y B*). Este resultado indica que el experimento *in silico* de *screening* virtual efectivamente logró predecir el comportamiento *in vitro* de del compuesto ZINC69391, ya que las estructuras utilizadas para llevar adelante el experimento de *docking*, provenían de estructuras cristalizadas de Rac1 interaccionando con Tiam1.

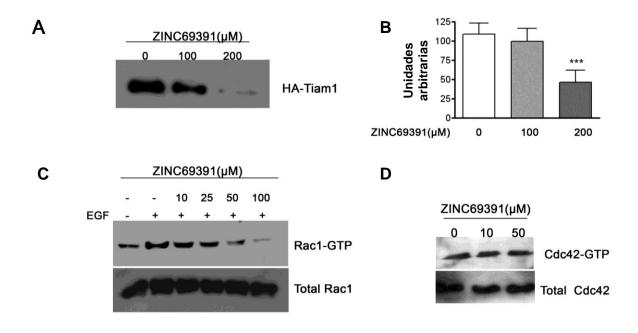


Figura II-1 ZINC69391 bloquea la activación de Rac1 en células de carcinoma mamario al interferir con la interacción Rac1-Tiam1. A, La inhibición de la interacción de Rac1-Tiam1 es concentración-dependiente. Se realizó una precipitación de afinidad utilizando Rac1 expresada en bacterias y lisados celulares sobreexpresando la versión constitutivamente activa de Tiam1-C1199 en presencia o ausencia de ZINC693961. B, Análisis densitométrico de los western blots mostrados en A. ***, p<0.001 ANOVA cont. Con el test de comparaciones múltiples de Dunnett's, cada barra representa la media ± SEM de tres experimentos independientes. C, Inhibición concentración-dependiente de Rac1 en células F3II tratadas con ZINC69391. Células F3II hambreadas, fueron tratadas por 1 h con diferentes concentraciones de ZINC69391 y luego estimuladas con EGF (100 ng/ml) por 15 minutos. D, Los niveles de activación de Cdc42 en células F3II no fueron afectados por el tratamiento con ZINC69391.

Efecto de ZINC69391 sobre los niveles de activación de Rac1 y evaluación de su especificidad in vitro

El EGF es uno de los activadores de la vía de señalización de Rac1 en diferentes tipos celulares descriptos en la bibliografía [135], siendo esta activación mediada por uno o más activadores de tipo GEFs, incluyendo a Tiam1 [136]. Con el fin de determinar si ZINC69391 es capaz de afectar la vía de señalización de Rac1, se estudiaron los niveles de activación de Rac1 en respuesta a la activación del EGFR con su ligando natural EGF, moléculas que se encuentran río arriba de Rac1.

Los niveles de Rac1-GTP se determinaron utilizando un ensayo de *pull down*, como se explicó anteiormente. La *Figura II-1C* muestra una disminución concentración-dependiente de los niveles de Rac1-GTP cuando células de carcinoma mamario murino F3II fueron tratadas con diferentes concentraciones de ZINC69391 en presencia de EGF, mientras que los niveles totales de Rac1 no fueron alterados. Además, a concentraciones altas de ZINC69391 se observó una reducción de los niveles de Rac1-GTP por debajo de los niveles basales no estimulados por EGF.

Asimismo, se determinó la especificidad de ZINC69391, evaluando el efecto de este compuesto sobre la activación de la GTPasa íntimamente relacionada Cdc42 [73]. Para ello, se llevó a cabo el ensayo de *pull down* con lisados de F3II tratados en condiciones de medio completo y detectando los niveles de Cdc42-GTP con un anticuerpo monoclonal anti Cdc42. Tal como se muestra en la *Figura II-1D*, ZINC69391 no afectó los niveles de Cdc42-GTP incluso a concentraciones en donde se observa una clara inhibición de la activación de Rac1. Estos resultados demuestran que el tratamiento con ZINC69391 provoca una clara inhibición de la activación de Rac1, mientras que los niveles de la GTPasa Cdc42 no se ven afectados.

Efecto de ZINC69391 sobre la proliferación celular in vitro sobre líneas de carcinoma mamario

Si bien previamente ya habíamos establecido que ZINC69391 afecta la viabilidad celular de la línea celular F3II, se estudió con mayor detalle dicho efecto. Para ello, se evaluó la capacidad antiproliferativa de ZINC69391 sobre la línea F3II de carcinoma mamario murino y sobre dos líneas de carcinoma mamario humano: MDA-MB-231 y MCF7. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de ZINC69391 por 72 hs en presencia de 10% de SFB. Posteriormente, se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo metabólico de MTT.

ZINC69391 fue capaz de inhibir la proliferación celular sobre un panel de líneas de cáncer mamario de manera concentración-dependiente, mostrando valores de IC $_{50}$ de 48 μ M para la línea humana de MDA-MB-231, de 31 μ M para la línea humana MCF7 y de 61 μ M para la línea murina F3II (*Figura II-2A*). Estos mismos experimentos fueron repetidos y cuantificados de utilizando el método directo de recuento con el test de exclusión de azul tripan, mostrando los mismos resultados.

Adicionalmente, se comparó el efecto antiproliferativo de ZINC69391 con el compuesto NSC23766, un inhibidor comercial existente para Rac1. NSC23766 presentó un valor de IC $_{50}$ de 140 μ M en células F3II. Esta capacidad antiproliferativa moderada del inhibidor NSC23766, se encuentran en línea con trabajos publicados anteriormente [112].

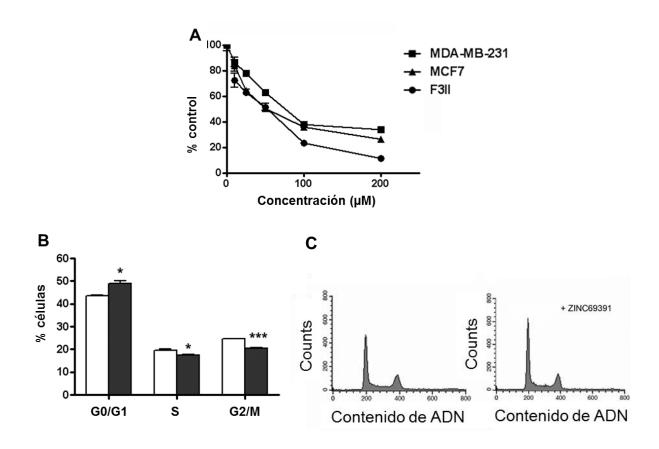


Figura II-2|ZINC69391 afecta la viabilidad celular y la progresión del ciclo celular en células de carcinoma mamario agresivo A, ZINC69391 inhibe la proliferación de líneas celulares de carcinoma mamario: F3II, MDA-MB-231 y MCF7. Las células fueron tratadas por 72 h con diferentes concentraciones de ZINC69391. La viabilidad celular fue medida con el ensayo de MTT. B y C, ZINC69391 arresta la progresión del ciclo celular en fase G1. Células MDA-MB-231 se sincronizaron y fueron tratadas por 48 h con ZINC69391 10 μΜ. Las células fueron fijadas, teñidas con ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo para estimar el porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo celular. Las barras representan la media \pm SD. *, p>0.05; ***, p>0.001 determinado por Test de Student vs. Control en cada fase.

Efecto de ZINC69391 sobre la progresión del ciclo celular sobre células de carcinoma mamario humano

Rac1 está implicado en el crecimiento celular a través de varios mecanismos, entre los cuales se encuentra la modulación la transcripción de diferentes genes. Uno de estos genes es el de *ciclina D1*, que induce la progresión G1/S en el ciclo celular [69, 137]. Para evaluar el efecto de ZINC69391 sobre la progresión del ciclo celular, células MDA-MB-231 sincronizadas fueron tratadas por 48 hs con ZINC69391 10 μM en la presencia de SFB. Los resultados de la *Figura II-2B y C* muestran que ZINC69391 provoca una acumulación de las células tratadas en la fase G1. Esto indica que la inhibición de la proliferación celular mediada por ZINC69391 se puede explicar en parte, como un arresto del ciclo celular en fase G1.

Determinación del efecto de ZINC69391 sobre la migración celular y la dinámica del citoesqueleto de actina

La migración e invasión celular son procesos claves en diferentes situaciones patológicas y son un aspecto fundamental en el proceso metastásico. Las Rho GTPasas regulan la motilidad celular y la reorganización del citoesqueleto de actina. Particularmente Rac1, dirige la migración celular al promover la formación de lamelipodios [138, 139].

Con el objetivo de evaluar el efecto de ZINC69391 sobre la migración celular, se llevaron adelante ensayos de herida en monocapa. En dicho ensayo, las células censan el espacio libre y migran hacia el interior de la herida [68]. Tal como se observa en la *Figura II-3B*, ZINC69391 provocó una significativa reducción de la capacidad migratoria de células F3II y MDA-MB-231, dos líneas celulares altamente invasivas.

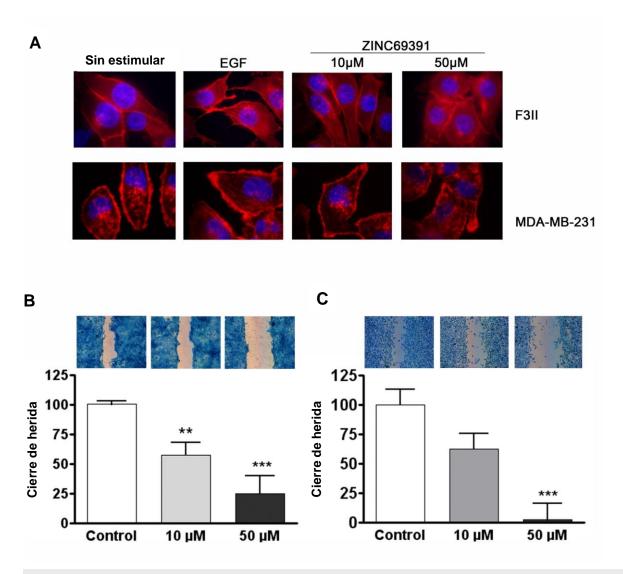


Figura II-3|ZINC69391 inhibe la reorganización del citoesqueleto de actina e inhibe la migración celular. A, Fotografías representativas de células F3II y MDA-MB-231 tratadas con ZINC69391 y tratadas por 15 min con EGF. Las células fueron fijadas y teñidas con AlexaFluor555-faloidina. B, Se realizaron heridas sobre monocapas confluentes de F3II y se realizaron tratamientos con ZINC69391 en presencia de SFB. Las células se incubaron 16 h, se fijaron y se tiñeron. Los resultados muestran porcentaje de herida cerrada expresada como media (n=10) ± SEM. ***, p<0.001 ANOVA cont. Dunnett's Multiple Comparison Test. C, el mismo diseño experimental se realizó utilizando células MDA-MB-231. **, p<0.01; ***, p<0.001 ANOVA cont. Dunnett's Multiple Comparison Test.

En el caso de células F3II, el tratamiento con 10 μ M y 50 μ M de ZINC69391 resultó en una inhibición de la migración del 50% y del 80% respectivamente comparado con el control. Mientras que en el modelo de MDA-MB-231, ZINC69391 provocó una disminución del 100% y del 40% con respecto al control después del tratamiento de 50 μ M y 10 μ M respectivamente.

Debido a que la migración celular está regulada por los cambios espaciotemporales del citoesqueleto de actina y está ampliamente aceptado el rol de Rac1 como regular de este proceso [68], se evaluó si la inhibición de la migración celular provocada por el tratamiento con ZINC69391 correlaciona con el modulación de la reorganización del citoesqueleto de actina. Experimentalmente está demostrado que EGF, PDGF e insulina son capaces de inducir lamelipodios ricos en actina y ondulaciones de membrana a través de la activación de Rac1 [140]. Utilizando EGF como estimulador de la formación de filamentos de actina, células de carcinoma mamario fueron hambreadas, tratadas con diferentes concentraciones de ZINC69391 y estimuladas con el factor de crecimiento. Dichas células fueron fijadas y luego teñidas utilizando la toxina faloidina conjugada con el fluorocromo AlexaFluor555. Dicha toxina presenta gran afinidad por la actina, lográndose un marcado específico de este componente del citoesqueleto. Anteriormente ya habíamos evidenciado que ZINC69391 provocaba una inhibición de la polimerización de los filamentos de actina en células F3II aún en presencia de EGF. En la Figura II-3, se observa el mismo efecto sobre células MDA-MB-231. Se evidencia un efecto inhibitorio con el tratamiento de 10 µM, siendo este efecto más marcado en el tratamiento de 50 µM.

Estudio de la toxicidad de ZINC69391 in vivo

Se llevaron a cabo ensayos de toxicidad aguda en el Centro de Medicina Comparada en el Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral de la Universidad Nacional del Litoral – CONICET. En este sentido se evaluaron dos dosis: 25 mg/kg y 125 mg/kg. El protocolo consistió en inocular a 5 ratones por dosis y en su observación por 14 días post-inoculacion. Los animales no manifestaron ninguna signología. Posteriormente se realizó la necropsia de los mismos, sin observar lesiones y remitiendo muestras hematológicas para análisis bioquímicos. Los ensayos arrojaron valores dentro de los valores de referencia de la especie. Estos datos indican que no se encontraron signos de toxicidad en las dosis ensayadas, indicando que una dosis cinco veces mayor a la cual se evaluará el efecto biológico del compuesto ZINC69391 no presenta toxicidad.

Efecto de ZINC69391 sobre la diseminación metastásica in vivo en un modelo murino singénico de metástasis experimental

En función de los resultados obtenidos *in vitro* sobre la actividad de ZINC69391 sobre células de carcinoma mamario, se evaluó el impacto del tratamiento con este compuesto sobre la colonización metastásica de células F3II en un modelo murino. Para cumplimentar dicho objetivo, se inyectaron 2x10⁵ células F3II viables en la vena lateral de la cola de ratones BALB/c (Día 0). Una vez inyectadas las células se administró diariamente una dosis de 25 mg/kg via i.p y en el día 21 los animales fueron sacrificados, se fijaron y tiñeron los pulmones y luego se cuantificaron las metástasis superficiales utilizando una lupa de disección.

El tratamiento diario con ZINC69391 redujo aproximadamente un 60% la formación de focos metastásicos totales (*Figura II-4*). Este mismo resultado se obtuvo considerando únicamente la formación de macrometástasis (focos mayores a 1 mm de diámetro). En resumen, el tratamiento diario con ZINC69391 presentó una fuerte actividad antimetastásica *in vivo*.

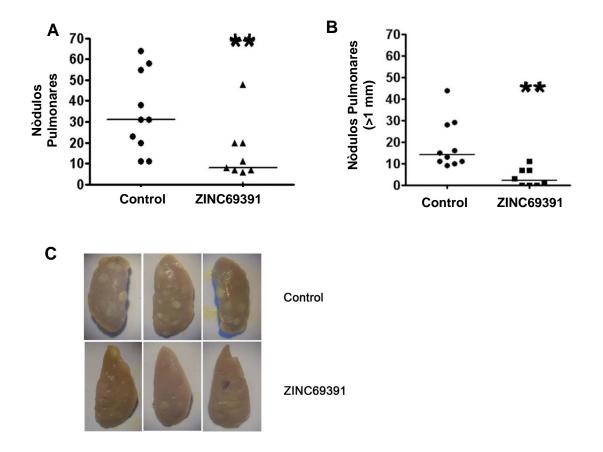


Figura II-3 | Efecto antimetastásico de ZINC69391 en células F3II. Utilizando un modelo de metástasis experimental de carcinoma mamario murino F3II, se trataron a los animales diariamente vía i.p con ZINC69391 25 mg/kg o vehículo por 21 días. Los animales se sacrificaron y se contaron los nódulos superficiales formados en los pulmones (n=10 control, n=8 tratado). A, Nodulos totales, B, Macronódulos (>1 mm de diámetro) **, p<0.01 Mann-Whitney Test. C, Fotografías representativas del lóbulo izquierdo pulmonar.

Diseño racional de análogos de ZINC69391

Una vez establecida la actividad antitumoral de ZINC69391 en modelos de carcinoma mamario murino, se prosiguió con la optimización del compuesto en búsqueda de compuestos selectivos y más potentes. Utilizando a ZINC69391 como estructura de partida se diseñaron una serie de derivados. Tal como se observa en la *Figura II-4*, se realizaron modificaciones en el anillo A, en el anillo B y en el puente C de la molécula parental.

Figura II-4 | **ZINC69391 utilizado como estructura líder.** Se diseñaron diferentes derivados modificando el anillo A, el anillo B y el puente C.

Tanto el diseño de los derivados como la síntesis de los mismos estuvieron a cargo del Laboratorio de Síntesis Orgánica del Centro de Química del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) dirigido por la Dra. Maria Julieta Comin, con quienes contamos con un convenio de colaboración.

Se comenzaron a desarrollar análogos variando la estructura del anillo pirimidínico (Anillo A), ya que se considera crucial para la interacción con Rac1. A partir de la estructura de rayos X de Rac1 se modeló la interacción de ZINC69391 y sus análogos utilizando el software AutoDock 4.2. La comparación de las energías

calculadas por el programa para los diferentes análogos y la inspección de las interacciones con Rac1 indicaron que modificaciones estructurales podrían lograr una mejora en la afinidad por la proteína. Se analizaron más de 60 estructuras y para muchas de ellas, se predijo una mayor afinidad (es decir, un menor K_i) por el blanco que el compuesto parental, tal como se muestra en la *Figura II-5*.

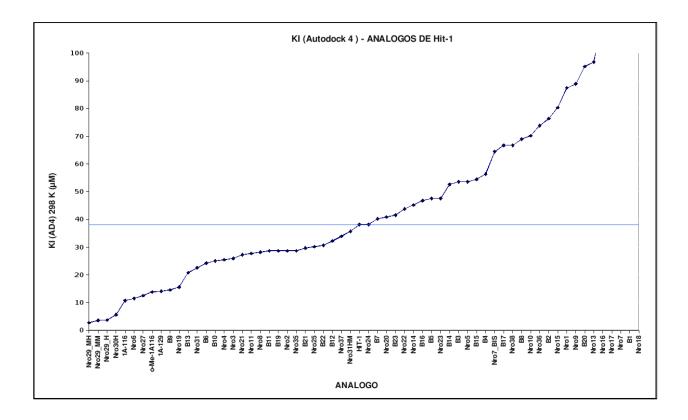


Figura II-5 | Valores de Ki arrojados por AutoDock 4.2 para análogos de ZINC69391. Se analizaron las interacciones de diferentes estructuras diseñadas a partir de la molécula parental. La línea continua celeste señala el valor de K_i arrojado por Autodock4 para ZINC69391, indicando que aquellos compuestos que presentan un Ki menor posiblemente tendría una mayor afinidad por el blanco que el compuesto de partida.

A partir de estos resultados, se sintetizaron una decena de compuestos y se los ensayó *in vitro* buscando un aumento en la potencia de ZINC69391 (resultados mostrados anteriormente). De este grupo de compuestos se seleccionó al análogo 1A-116 (*Figura II-6*) que presentó un mayor efecto antiproliferativo que el parental. Estos resultados están en línea con los análisis *in silico* previamente realizados a cargo del Dr. Adrian Turjanski de INQUIMAE, en la Facultad de Ciencias Exactas ty Naturales, UBA; que muestran que la energía libre de la unión predicha para el análogo resultó ser mayor (-6.77 Kcal/mol para 1A-116 vs. -5.86 Kcal/mol para ZINC69391).

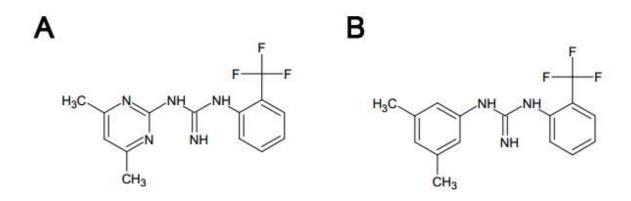


Figura II-6| Estructuras del compuesto parental ZINC69391 y el análogo 1A-116. A Estructura química de ZINC69391 ($C_{14}H_{15}F_3N_5$; PM: 310.303 B, Estructura química de 1A-116 ($C_{16}H_{16}F_3N_3$; PM: 307.31)

Como se observa en la *Figura II-7*, ambos compuestos comparten la misma pose y las interacciones clave, es decir, que se mantienen las uniones puente de hidrógeno y el *pi-stacking* observados anteriormente para ZINC69391. Probablemente, el aumento en la afinidad predicha en concordancia con los datos

in vitro puede ser atribuible a diferencias en la solvatación y en la interacción con el Trp56. Mientras que ZINC69391 presenta un anillo pirimidinico relativamente polar que puede mantener uniones puente de hidrógeno con un solvente como el agua, 1A-116 presenta un anillo bencénico más hidrofóbico. De hecho, el valor del coeficiente de reparto (Log P) predicho para 1A-116 es mayor que el de ZINC69391 (4.41 vs. 3.85). Por otro lado, las interacciones de *pi-stacking* con el Trp56 parecen ser más fuertes por el reemplazo del anillo pirimidínico por uno bencénico.

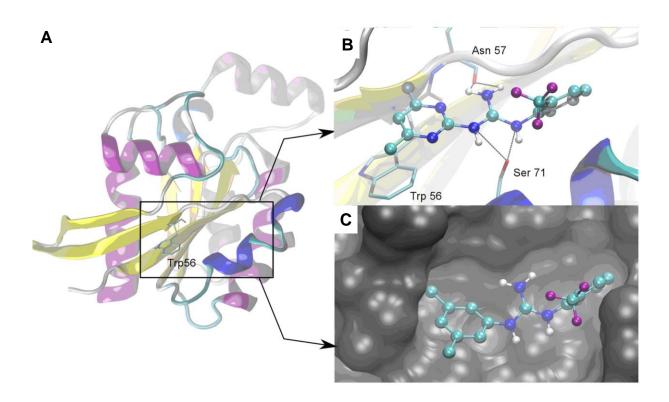


Figura II-7 | Mejores poses de *docking* para ZINC69391 y su análogo 1A-116. *A,* Representación de la estructura de Rac1 mostrando el sitio de unión definido por Trp56. **B**, El sitio de unión de ZINC69391 mostrando las interacciones claves. **C**, Superficie de Rac1 con la pose de *docking* de 1A-116.

Efecto antiproliferativo de 1A-116 mediante un mecanismo basado en Rac1

Con el objetivo de evaluar el efecto de 1A-116 sobre la proliferación celular de F3II, se midió la viabilidad celular utilizando el ensayo metabólico de MTT. La poca solubilidad en medio acuoso del análogo 1A-116, resultó en un desafío clave para los ensayos a realizar. En este sentido, se contó con la colaboración del Lic. Eduado Spitzer del Laboratorio ELEA y se desarrolló una formulación en medio ácido que permitió solubilizar el compuesto.

1A-1116 fue capaz de inhibir la proliferación celular de manera concentración-dependiente y mostró tener una actividad antiproliferativa más potente que el compuesto parental. El valor de IC_{50} del análogo fue de 4 μ M, un valor 15 veces menor que el compuesto parental. También se encontró este mejor desempeño en células MDA-MB-231, donde el valor de IC_{50} para 1A-116 fue de 21 μ M mientras que el parental presenta un valor de 48 μ M (Tabla III).

Tabla III. Valores de IC50 comparando ZINC69391 y el análogo 1A-116

	ZINC69391 (μM)	1Α-116 (μΜ)
MDA-MB-231	48	21
F3II	61	4

Por otra parte, con el objetivo de determinar si el efecto antitumoral del análogo depende de la inhibición de la vía de señalización de Rac1 se estudió el efecto antiproliferativo de 1A-116 en células MDA-MB-231 sobreexpresando una variante constitutivamente activa de Rac1, denominada Rac1-G12V.

Esta variante permite que la vía de Rac1 se encuentre siempre activa, independientemente de la actividad de los activadores tipo GEF. Como es de

esperar, en la *Figura II-8* se muestra que la sobreexpresión de Rac1-G12V atenuó significativamente el efecto inhibitorio de 1A-116 sobre la proliferación celular en relación a las células transfectadas con el vector vacío.

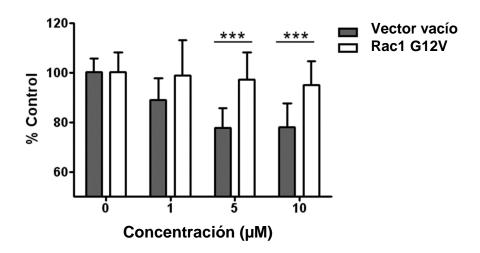


Figura II-8|Expresión de la variante Rac1-G12V atenúa el efecto de 1A-116. Células MDA-MB-231 fueron transfectadas con Rac1-G12V o vector vacío y tratadas por 48 hs con 1A-116. Barras, media ± SD. ***, p<0.001 Vector vacío vs. Rac1-G12V a cada concentración. ANOVA de dos vías cont. Bonferroni Test

Efecto de 1A-116 sobre la interacción P-Rex1-Rac1 y los niveles de activación de Rac1

Evidencias fuertes surgidas recientemente indican que el activador tipo GEF específico para Rac1 P-Rex1, cumple un rol clave en la progresión del cáncer mamario. Por ello evaluamos si 1A-116 es capaz de interferir la interacción de Rac1 con dicho GEF utilizando un ensayo de precipitación de afinidad. Debido a que MCF7 expresa niveles altos de P-Rex1 [94], un lisado celular de dicha línea fue incubado con la proteína de fusión Rac1-GST acoplada a microesferas de glutatión. Dicho ensayo fue revelado realizando un western blot utilizando un anticuerpo anti

P-Rex1. Tal como se observa en la *Figura II-9A*, 1A-116 fue capaz de interferir la formación del complejo Rac1-P-Rex1 *in vitro*.

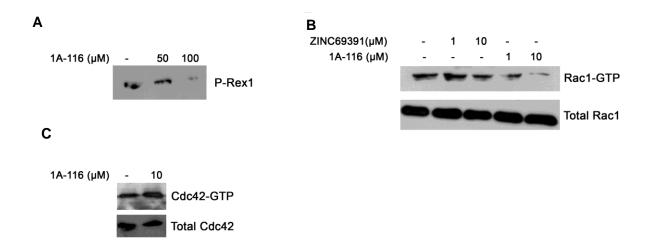


Figura II-9|1A-116 interfiere con la interacción Rac1-P-Rex1, siendo más potente que el compuesto parental ZINC69391. A, Precipitación de afinidad que demuestra que 1A-116 es capaz de bloquear la interacción de P-Rex1-Rac1. B, Células F3II fueron tratadas por 12 h con ZINC69391 y 1A-116. Se llevaron a cabo los *pull down* y se analizaron los resultados por western blot. C, 1A-116 no afecta la activación de Cdc42, una GTPasa íntimamente relacionada.

Por otro lado, evaluamos el efecto de 1A-116 sobre los niveles de activación de Rac1. Para ello, llevamos adelante un ensayo de *pull down* con células F3II tratadas por 12 h en condiciones de medio completo. Se observa en la *Figura II-9B* que el análogo 1A-116 fue capaz de disminuir los niveles Rac1-GTP de manera concentración-dependiente. Es interesante notar, que 1A-116 inhibió dramáticamente la activación de Rac1 a concentraciones en el rango del micromolar bajo (1 μ M). Por el contrario, ZINC69391 no mostró efecto con un tratamiento de 1μ M, mientras que se observa un efecto modesto a una

concentración de $10~\mu\text{M}$ bajo estas condiciones experimentales. Los niveles totales de Rac1 no se vieron afectados con el tratamiento. Estos resultados muestran que 1A-116 es un inhibidor de Rac1 más potente que el compuesto parental ZINC69391.

Por otro lado, evaluamos la especificidad del análogo 1A-116. Realizamos un ensayo de *pull down* con células F3II para determinar el efecto del análogo sobre la activación de la GTPasa Cdc42, que está íntimamente relacionada con Rac1. Tal como se observa en la *Figura II-9C*, 1A-116 no afecta la activación de Cdc42 a 10 μM, concentración a la cual se observa un drástico efecto sobre los niveles de Rac1-GTP (*Figura II-8B*).

Estudio de la toxicidad del análogo 1A-116 in vivo

Al igual que con el compuesto parental se llevaron a cabo estudios de toxicidad aguda con el análogo 1A-116 en el Centro de Medicina Comparada de la Universidad Nacional del Litoral. Se ensayaron cuatro dosis diferentes: 3.7 mg/kg, 31 mg/kg, 68 mg/kg y 136 mg/kg. La dosis máxima tolerada (MTD) fue de 31 mg/kg mientras que la dosis letal 50% (DL50) fue de aproximadamente 68 mg/kg. La dosis de 3.7 mg/kg no mostró signos de toxicidad. Posteriormente, estos animales fueron sacrificados y se realizaron los análisis correspondientes. Análisis bioquímicos mostraron valores dentro de los esperados para la especie, por lo tanto no es posible detectar en que órgano se producen las lesiones. La signología aguda sugiere que el sistema nervioso central sería el afectado.

Estos datos permiten determinar que la dosis a utilizar para los ensayos de respuesta antitumoral (3 mg/kg) no es tóxica y es 10 veces menor a la dosis máxima tolerada.

Efecto antimetastásico del análogo 1A-116

Se evaluó el efecto de 1A-116 sobre la colonización pulmonar *in vivo* de células F3II llevando adelante un protocolo de metástasis experimental, tal como se explicó anteriormente. El tratamiento diario con el análogo 1A-116 con una dosis de 3 mg/kg/dia redujo en un 60% la formación de nódulos metastásicos. Se observó una actividad antitumoral significativa, al considerar la formación de macronódulos (diámetro >1 mm) (*Figura II-10*).

Es interesante resaltar que 1A-116 mostró un efecto antimetastásico más potente que el compuesto parental ZINC69391, observándose un efecto similar a una dosis 8 veces menor (3 mg/kg/dia vs. 25 mg/kg/dia)

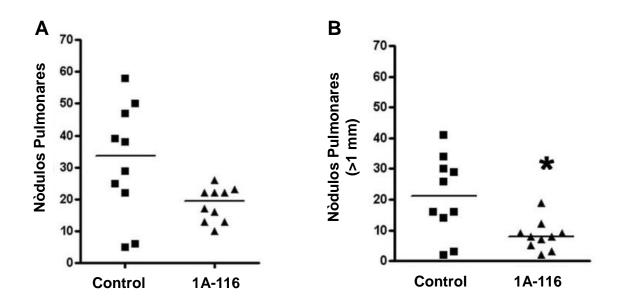


Figura II-10|1A-116 presenta efecto antimetastásico a una dosis 8 veces menor que el partenal. A, Número total de nódulos metastásicos. Grupo control (vehículo) vs. Tratamiento 3 mg/kg/dia de 1A-116. *, p<0.05 Mann-Whitney test. **B**, Formación de macronódulos (>1 mm de diámetro). *, p<0.05 Mann-Whitney Test.

Efecto antitumoral in vivo de ZINC69391 vs. 1A-116

Finalmente, se evaluó el efecto de las moléculas evaluadas sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Para ello, se inocularon 2x10⁵ células F3II en el subcutis de ratones Balb/c y posteriormente comenzó el tratamiento diario de los mismos. Se establecieron 3 grupos experimentales: Control (vehículo), ZINC69391 (20 mg/kg/día) y 1A-116 (3 mg/kg/día).

Tal como se observa en el *Figura II-11A*, el tratamiento diario tanto del compuesto parental ZINC69391 como el análogo 1A-116 presentaron actividad antitumoral *in vivo* con respecto al control. Se observa que ambos tratamientos provocaron una disminución significativa del volumen tumoral al final del experimento (Figura II-11B). Más aún, analizando las curvas de crecimiento se observa una menor tasa de crecimiento en aquellos tumores que recibieron el tratamiento de 1A-116 con respecto al tratamiento de ZINC69391 y ambos tratamientos con respecto al control (*Figura II-11B*). Es importante destacar, que la dosis de 1A-116 es 7 veces menor a la administrada de ZINC69391, mostrando un efecto más potente sobre la progresión tumoral.

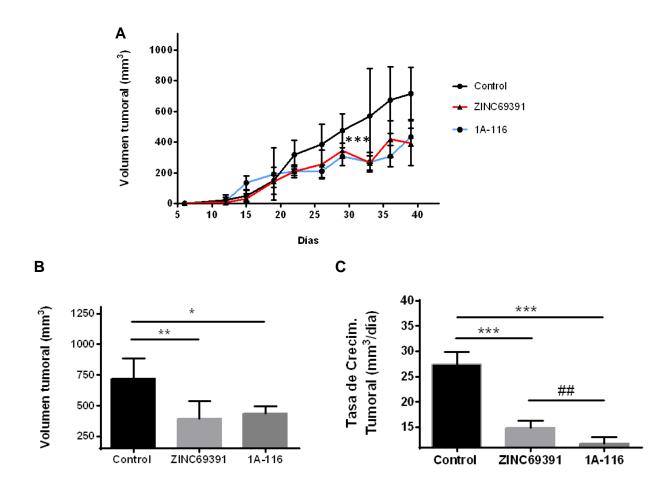


Figura II-10|ZINC69391 y 1A-116 presentan efecto antitumoral *in vivo*. Se llevó a cabo un protocolo de progresión tumoral in vivo utilizando un modelo murino singénico (Células F3II) A, Curvas de crecimiento tumoral de grupo control (negro), grupo ZINC69391 20/mg/kg/día (rojo), grupo 1A-116 3 mg/kg/día (azul). Diferencia significativa entre las pendientes analizadas. ANOVA Con.t el test de comparación multiple de Tukey's. ***p<0.001 ambos tratamientos vs. Control B, Volumen tumoral al final del protocolo. ANOVA, contrastado con el test de comparación multiple de Tukey's, * p< 0.05; ** p< 0.01 (vs. Control). C, Tasa de crecimiento tumoral. Pendientes de la Regresión Lineal (día 12 – 39). ANOVA, contrastado con el test de comparación multiple de Tukey's Tukey's, *** p< 0.001 (vs. Ctrol); ## p< 0.01

Conclusiones - Capítulo II

- ZINC69391 es capaz de interferir la interacción de Rac1- Tiam1 in vitro y este resultado concuerda con lo predicho in silico.
- ZINC69391 es capaz de inhibir la activación de Rac1 de manera concentración dependiente en respuesta a EGF, sin afectar la activación de Cdc42, una GTPasa íntimamente relacionada.
- ZINC69391 presenta efecto antiproliferativo en un panel de líneas de carcinoma mamario y este efecto se debe, al menos en parte, por un arresto del ciclo celular en fase G1.
- ZINC69391es capaz de inhibir la migración celular in vitro y disminuye un 60% la formación de nódulos metastásicos. Estudios de toxicidad aguda indican que ZINC69391 no presenta toxicidad a las dosis evaluadas.
- A partir de la estructura del compuesto parental ZINC69391, se diseñó y sintetizó el análogo 1A-116 que resultó ser un compuesto más potente in vitro e in vivo, tal como había sido predicho por docking.
- 1A-116 es capaz de inhibir la activación de Rac1 a concentraciones menores que el compuesto parental, sin alterar los niveles de activación de Cdc42.
 1A-116 es capaz de interferir la interacción de Rac1-P-Rex1, un GEF clave para la progresión de tumores mamarios.
- La actividad antiproliferativa de 1A-116 depende de la inhibición de la vía de Rac1.
- El análogo 1A-116 mostró una actividad antitumoral mejorada con respecto al compuesto parental *in vivo*.

• .

Desarrollo de nuevos inhibidores de Rac1 en un modelo de glioblastoma multiforme humano

Los gliomas son las neoplasias cerebrales primarias más comunes del sistema nervioso central y presentan una media de sobrevida de menos de 1 año a pesar de los tratamientos disponibles actualmente que consisten en cirugía, radio y quimioterapia [42]. Si bien los gliomas presentan un potencial metastásico limitado, se caracterizan por un gran invasividad local. La migración e invasión de células de glioma son los mayores desafíos para el tratamiento de estos tumores, ya que son los procesos que claves que contribuyen con la recurrencia de la enfermedad y la progresión tumoral [58].

Debido a que la vía de señalización de Rac1 presenta un rol clave en la regulación de la migración e invasión celular mediante la modulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, se consolida como un blanco molecular atractivo para el tratamiento de gliomas [141]. En astrocitomas, Rac1 se encuentra sobreexpresada en los tumores más agresivos. En este sentido, se observa una localización de Rac1 en membrana en un subset de glioblastomas, pero dicha marca está ausente en astrocitomas de grado bajo y en tejido cerebral no neoplásico, indicando que Rac1 se encuentra hiperactivado en glioblastomas [98].

Es importante destacar que diferentes Rac1-GEFs son mediadores clave de la motilidad celular, tales como Dock-180, Vav3, Ect2 y Trio [98, 99].

Considerando que el mayor desafío en la terapéutica de gliomas es el potencial invasivo de las células de glioma y la vía de Rac1 tiene un rol clave en la regulación de dichos eventos celulares, se llevó adelante el estudio del efecto del compuesto parental ZINC69391 y su análogo 1A-116 sobre modelos de glioblastoma multiforme humanos.

Determinación del efecto de ZINC69391 sobre la interacción de Rac1 - Dock-180

ZINC69391 se desarrolló utilizando como blanco específico el residuo Trp56 de Rac1 para inhibir la activación de esta proteína por GEFs. El rol de este residuo clave fue descripto desde hace más de una década para GEFs pertenecientes a la clásica familia Dbl [76, 77]. Sin embargo, recientemente también estableció que el Trp56 es importante para la interacción de Rac1 con el GEF Dock-180, que pertenece a la familia atípica de GEFs tipo Dock [78]. Particularmente, Dock-180 está considerado en la literatura como uno de los GEFs claves en la capacidad invasiva de células de glioma [99]. Por consiguiente, determinamos el efecto de ZINC69391 en la interacción de Rac1 con su GEF atípico Dock-180.

Para ello, se utilizó un lisado de la línea LN229 que expresa niveles elevados de Dock-180. Estos lisados fueron incubados con la proteína de fusión GST-Rac1 acoplados a microesferas de glutatión-agarosa en la presencia o ausencia del compuesto. Posteriormente, se llevó a cabo un Western Blot utilizando un anticuerpo específico anti Dock-180. Como se observa en la *Figura III-1A*, Rac1 y Dock-180 son capaces de interactuar (banda control) y la presencia de ZINC69391 inhibe dicha interacción *in vitro*. Esto evidencia que ZINC69391 es capaz de inhibir la activación de Rac1 mediada por GEFs de la familia atípica de Dock-180.

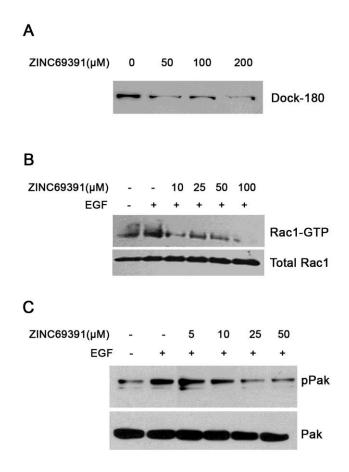


Figura III-1 | ZINC69391 inhibe la activación de la vía de Rac1 en células de glioma LN229. A, Bloqueo de la interacción de Rac1-Dock180. Se realizó una precipitación de afinidad utilizando una construcción Rac-GST inmovilizadas en microesferas de glutatión. Luego se llevó a cabo un Western Blot utilizando un anticuerpo anti Dock180. B, Inhibición de concentración—dependiente de la activación Rac1 en células de glioma bajo el tratamiento con ZINC69391. Células hambreadas fueron tratadas por 1 h y luego estimuladas por 15 min con EGF (100ng/ml). C, Inhibición concentración-dependiente de la fosforilación de Pak1, un efector clave de Rac1. Células hambreadas fueron tratadas por 1 h y luego estimuladas por 15 min con EGF (100ng/ml).

Evaluación del efecto de ZINC69391 sobre la activación de Rac1 y su efector Pak1

Una vez determinado que ZINC69391 es capaz de interferir la interacción de Rac1 con uno de los GEFs importantes en la biología tumoral de células de glioma, se determinó si efectivamente era capaz de inhibir la activación de Rac1 en células humanas de glioma LN229. El tratamiento consistió en una incubación de 1 hora con diferentes concentraciones de ZINC69391 y posteriormente el estímulo de 15 minutos con EGF. Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo de *pull down*, tal como se explicó anteriormente. Como se muestra en la *Figura III-1B*, el tratamiento con ZINC69391 resultó en una reducción de los niveles endógenos de Rac1-GTP sin afectar los niveles totales de la proteína. Se observa que el tratamiento de 10 μM provoca una significativa reducción de la activación de Rac1.

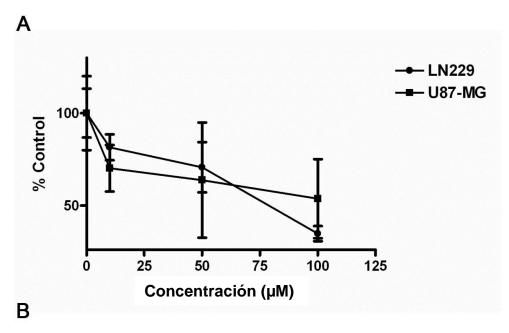
También se evaluó el efecto de ZINC69391 sobre los niveles de Pak1 fosforilado. Pak1 es una proteína efectora de Rac1 y su activación media varios de los eventos regulados por Rac1, tal como regulación de la dinámica de citoesqueleto, de la adhesión y de la transcripción [137]. En este sentido, está descripto que Pak1 presenta un rol importante en proliferación, sobrevida e invasión de células transformadas [142]. Particularmente, en muestras de pacientes con glioma se evidenció que niveles altos de fosforilación de Pak1 en el citoplasma correlaciona con una menor sobrevida [143]. Con el objetivo de determinar el efecto de ZINC69391 sobre los niveles de fosforilación de Pak1, células LN229 fueron tratadas durante 1 h con diferentes concentraciones del compuesto y luego estimuladas por 15 minutos con EGF. Posteriormente, se reveló el experimento utilizando la técnica de western blot y dos anticuerpos específicos anti-Pak1 y anti-pPak1. Como se muestra en la *Figura III-1C*, ZINC69391 mostró inhibición de la fosforilación de Pak1 a partir de una concentración de 10 μM en la presencia de EGF. Más aún, concentraciones más altas provocaron descensos a

niveles comparables con la condición sin estimulación de EGF. En resumen, demostramos que ZINC69391 es capaz de inhibir efectivamente la vía Dock-180/Rac1/Pak1, la cual es considerada relevante para la progresión de gliomas.

Efecto de ZINC69391 sobre la proliferación celular y la progresión del ciclo celular en líneas de glioma humano

Después de determinar el efecto de ZINC69391 sobre la vía de señalización de interés, estudiamos el efecto del compuesto sobre eventos celulares en donde Rac1 posee un rol relevante. Por consiguiente, en primer lugar se determinó la capacidad antiproliferativa de ZINC69391 sobre células de glioblastoma humano. Para ello, se realizaron tratamientos con diferentes concentraciones de ZINC69391 por 72 hs sobre células LN229 y U-87-MG de glioma humano. Posteriormente, se midió la viabilidad celular utilizando en método del MTT. El tratamiento con ZINC69391 resultó en un descenso de la viabilidad celular en ambas líneas celulares (*Figura III-2A*).

Nuevamente con el objetivo de delinear el mecanismo de inhibición de la proliferación celular, determinamos el efecto de ZINC69391 sobre la progresión del ciclo celular. Tal como observamos en el modelo de carcinoma mamario, ZINC69391 provocó un aumento del número de células en la fase G1. Este aumento también se evidenció en la fase sub-G0. Este efecto fue dosis-dependiente y mostró que el efecto antiproliferativo de ZINC69391, se explica en parte como un arresto del ciclo celular en fase G1 (*Figura III-2B*).



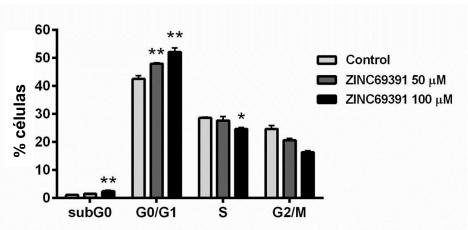


Figura III-2 | ZINC69391 afecta la proliferación celular y el ciclo celular en células de glioma.

A, ZINC69391 inhibe la proliferación celular. Células LN229 y U87-MG fueron tratadas por 72 h con diferentes concentraciones de ZINC69391. Se midió la viabilidad celular con el ensayo de MTT. **B,** ZINC69391 arresta la progresión del ciclo celular en fase G1. Células LN229 fueron sincronizadas y tratadas por 48 hs con diferentes concentraciones de ZINC69391 en presencia de SFB. Las células fueron fijadas, teñidas con ioduro de propidio y analizadas por citometría para estimar los porcentajes de la población en cada fase del ciclo celular. Barras, SEM. *, p<0.05; **, p<0.01 determinado por ANOVA cont. Con el test de comparación múltiple de Dunnett´s vs. control en cada fase.

Evaluación del efecto de ZINC69391 sobre la apoptosis de células de glioma humano

La actividad de Rac1 está vinculada con la activación de vías de sobrevida como JNK y MAPK y su sobreactivación se asocia a un aumento a la resistencia a la apoptosis en diferentes tipos tumorales [144-146]. Particularmente en células de glioma, la supresión de Rac1 induce apoptosis tanto en líneas celulares como en

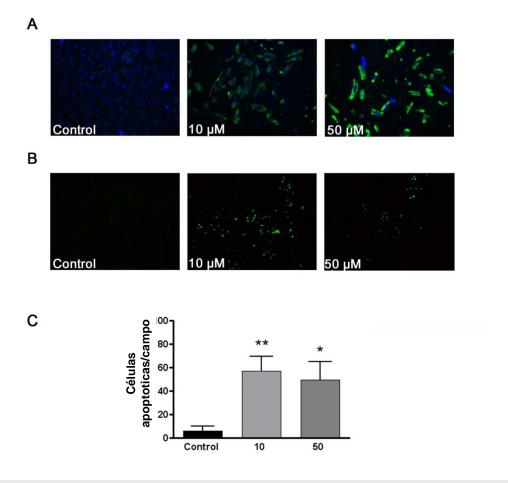


Figura III-3|ZINC69391 presenta un efecto proapoptótico en células de glioma. A, Apoptosis de células LN229 tras el tratamiento de 10 y 50 μM de ZINC69391 por 6 h utilizando la tinción de Anexina V. B, Apoptosis tardía evaluada con el sistema de TUNEL. C, cuantificación de células apoptóticas por campo utilizando la técnica de TUNEL. *p<0.05. **, p<0.01. ANOVA cont. Con el test de comparación múltiple de Dunnett´s versus control.

cultivos primarios de pacientes con glioma grado III y grado IV [147].

Teniendo esto en cuenta, se determinó la posible actividad pro-apoptótica de ZINC69391. Se evaluó la actividad de ZINC69391 sobre el evento de apoptosis utilizando dos metodologías diferentes. En primer lugar, utilizamos la tinción con AnexinaV conjugada con AlexaFluor488 para marcar diferencialmente células LN229 que sufrieran la pérdida de asimetría de fosfolípidos de membrana, evento temprano en la apoptosis. Como se observa en la *Figura III-3A*, ZINC69391 fue capaz de inducir apoptosis comenzando a una concentración de 10 μM.

En segundo lugar, determinamos el efecto de ZINC69391 sobre el evento de apoptosis utilizando la técnica de TUNEL. Esta técnica es capaz de determinar si las células en estudio presentan fragmentación de ADN, evento tardío en el proceso de apoptosis. En la *Figura III-3B*, se observa que ZINC69391 provoca un efecto proapoptótico significativo comenzando en 10 μM (*Figura III-3B y C*). En resumen, se confirmó por dos técnicas diferentes que ZINC69391 presenta un efecto proapoptótico mediante la inhibición de Rac1.

Efecto de ZINC69391 sobre migración e invasión de células de glioma

Una de las funciones clave de Rac1 es la regulación del comportamiento invasivo e infiltrativo de los gliomas. Esta GTPasa modula la formación de lamelipodios, la migración celular y la invasión de células de glioblastoma [148]. Con el fin de determinar el efecto del inhibidor sobre la capacidad migratoria de células de glioma, llevamos adelante un ensayo en *transwell* que consistió en la siembra de células LN229 hambreadas en la parte superior de la cámara en presencia o ausencia del ZINC69391, mientras que en la parte inferior se utilizó SFB como quimioatractante. Se incubaron por 16 h y luego las células que migraron fueron fijadas y teñidas con cristal violeta para realizar el recuento. Los resultados

muestran que el tratamiento con ZINC69391 provocó una significativa inhibición concentración-dependiente de la migración celular de células LN229 (Figura III-4A).

Debido a que el componente principal del fenotipo invasivo de los gliomas es la migración celular [149], se esperaba que la invasión celular también se viera afectada por la presencia de ZINC69391. Con el objetivo de evaluar dicha hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de invasión celular utilizando un *coating* de Matrigel en los *transwell*. Se siguió con el mismo procedimiento antes descripto, incubando las células 48 hs. Efectivamente, ZINC69391 inhibió significativamente la invasión celular de células LN229, observándose una respuesta concentración-dependiente (*Figura III-4B*).

Asimismo, se determinó si la reorganización del citoesqueleto era afectada por el tratamiento con ZINC69391, ya que Rac1 modula la motilidad celular principalmente por la regulación de la dinámica del citoesqueleto [150]. Tal como se observa en la *Figura II-4C*, donde se muestran fotos representativas de células en presencia o ausencia de ZINC69391 estimuladas con un pulso de EGF por 15 min, el inhibidor es capaz de interferir en la dinámica del citoesqueleto de actina observándose filamentos de actina despolimerizados cuando las células fueron tratadas con ZINC69391. Este mismo efecto se observa en células hambreadas sin estimular (*Figura III-4C*).

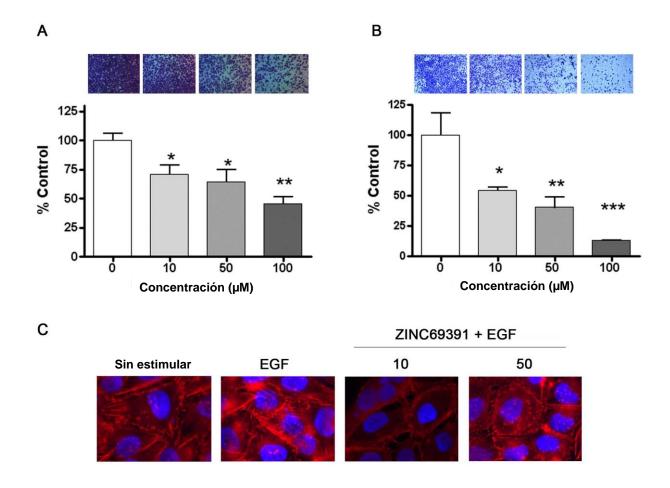


Figura III-4|ZINC69391 inhibe la migración e invasión de células de glioma modulando el citoesqueleto de actina. A, Células LN229 fueron sembradas en transwell e incubadas por 18 h con diferentes concentraciones de ZINC69391. Barras, SEM. *, p<0.05; ***, p<0.001, determinado por ANOVA cont. Con test de comparación multiple de Dunnett´s. B, Células LN229 fueron sembradas en transwell con coating de Matrigel e incubadas por 48 con diferentes concentraciones de ZINC69391. Barras, SEM. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 determinado por ANOVA cont. Con test de comparación multiple de Dunnett´s. C, Fotografías representativas tomadas a 1000X mostrando la inhibición de la reorganización del citoesqueleto de actina por ZINC69391 en células LN229.

Evaluación del efecto in vivo de ZINC69391 en un modelo murino xenogénico ortotópico de glioblastoma

Con el objetivo de evaluar el posible efecto antitumoral *in vivo* de ZINC69391, se estudió el efecto del tratamiento diario con el inhibidor en un modelo ortotópico intracraneal en ratones atímicos. Para ello, los animales fueron operados e inoculados con células LN229 en el cuerpo estriado utilizando un marco estereotáxico. 6 días después de la implantación se comenzó con un tratamiento i.p diario de vehículo o 20 mg/kg de ZINC693691. Este tratamiento resulto en un aumento significativo de la sobrevida de los animales (P=0.0151, log-rank test comparado con el control) (*Figura III-5*).

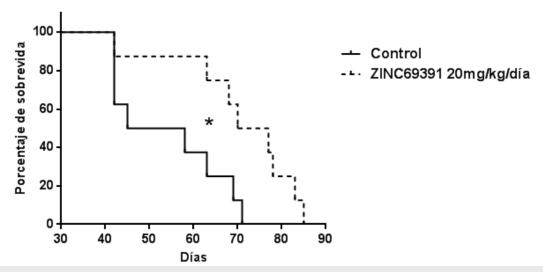


Figura III-5 | Análisis de sobrevida en respuesta a tratamiento con ZINC69391. Curva Kaplan-Meyer de ratones atímicos con glioblastoma humanos intracraneales tratados con ZINC69391. En este experimento, dos grupos de 8 ratones recibieron inyecciones diarias vía i.p de ZINC69391 20 mg/kg/día o vehículo comenzando 6 días post-implantación del tumor. La media de sobrevida del grupo control fue de 51 días mientras que el tratamiento con ZINC69391 resultó en una mediana de sobrevida de 73 días (*, p<0.05. Log-rank (Mantel-Cox) test)

El análogo 1A-116 presenta un efecto antiproliferativo y antiinvasivo más potente que el compuesto parental

Como se explicó anteriormente en el capítulo anterior, el diseño racional de nuevos derivados permitió identificar a 1A-116 como un análogo más potente que el compuesto parental ZINC69391. Con el objetivo de determinar la actividad de dicho análogo sobre células de glioblastoma multiforme, se llevaron adelante ensayos de proliferación celular en dos líneas celulares humanas de glioblastoma: LN229 y U87-MG. Para el mismo, se trataron las células por 72 hs y se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT. El tratamiento con 1A-116 inhibió la proliferación celular de manera concentración-dependiente, mostrando un mayor efecto que el compuesto parental en ambas líneas celulares (Figura III-6A).

Con el objetivo de determinar si estos compuestos presentan actividad antiproliferativa mediante la inhibición de Rac1, se evaluó el efecto de 1A-116 en células LN229 con Rac1 silenciado utilizando la tecnología de ARN de interferencia (ARNi). Como se observa en la Figura III-6B, el silenciamiento de Rac1 atenuó significativamente el efecto inhibitorio que presenta 1A-116 sobre la proliferación celular comparando con células control. Este resultado muestra que la presencia del blanco es indispensable para que la actividad antiproliferativa del análogo 1A-116.

También se evaluó el efecto de 1A-116 sobre la capacidad invasiva de células LN229. El tratamiento con 50 μ M de 1A-116 resultó en una reducción significativa de la invasión celular, tal como se muestra en la Figura III-6C. En este sentido, el análogo 1A-116 demostró tener una actividad más potente sobre la invasión celular con respecto al compuesto parental.

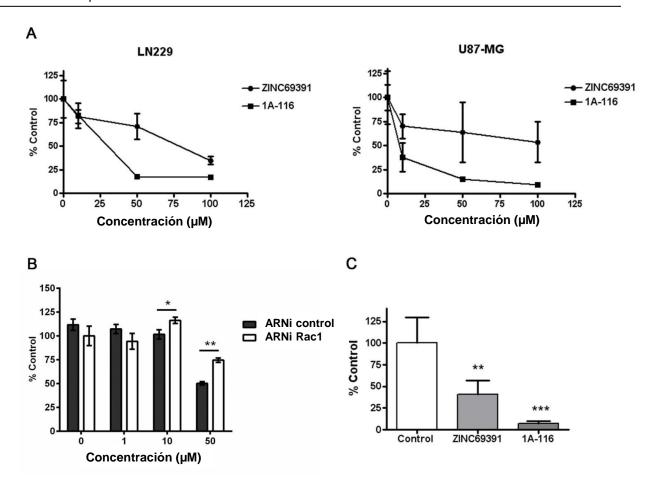


Figura III-6| El análogo 1A-116 es un inhibidor más potente de Rac1. A, Células LN229 y U87-MG fueron tratadas por 72 h con diferentes concentraciones de ZINC69391 y 1A-116. La viabilidad celular fue medida con MTT. B, Células LN229 fueron transfectadas transcientemente con ARNi de Rac1 o ARNi control. Se realizaron tratamientos por 72 h con diferentes concentraciones de 1A-116 y la viabilidad celular fue medida utilizando MTT. ANOVA de doble vía, contraste de límites de confianza de la media (95%, 99%). *p<0.01; ***, p<0.001. ANOVA cont. Con Dunnet´s Multiple Comparison Test. C, Células LN229 fueron sembradas en transwells con coating de Matrigel en presencia de 50 μM ZINC69391 o 1A-

Conclusiones – Capítulo III

- ZINC69391 es capaz de interferir la interacción de Rac1-Dock-180, disminuir los niveles de Rac1-GTP de manera concentración dependiente en respuesta a EGF y reducir la fosforilación de Pak1, un efector río abajo de Rac1.
- ZINC69391 presenta actividad antirpoliferativa sobre dos líneas de glioblastoma humano y este efecto se correlaciona con un arresto del ciclo celular en fase G1 y una inducción de la apoptosis.
- ZINC69391 es capaz de inhibir la migración e invasión tumoral en células de glioblastoma humano.
- ZINC69391 provoca un aumento del 50% de la sobrevida en un modelo xenogénico ortotópico de glioma.
- El análogo 1A-116 es un inhibidor más potente que el compuesto parental en líneas de glioblastoma humano y este efecto está mediado por la vía de Rac1.

Desarrollo de nuevos inhibidores de Rac1 en modelos de cáncer mamario agresivo

Numerosas evidencias muestran que las Rho GTPasas se encuentran involucradas en diferentes eventos vinculados al fenotipo transformado. En particular, la GTPasa Rac1 cumple un rol preponderante en la regulación de diferentes procesos como en la reorganización del citoesqueleto de actina, la migración celular y la proliferación [68]. La regulación de dichos eventos resulta de una modulación finamente controlada por diferentes activadores (GEFs) e inhibidores (GAPs). Debido a su rol central en diferentes eventos celulares, la regulación aberrante de Rac1 o su sobreexpresión se asocia con transformación oncogénica y metástasis en diferentes tipos tumorales incluyendo al carcinoma mamario. Es importante resaltar que en la mayoría de los casos, la señalización aberrante está dada por diferentes alteraciones en las proteínas regulatorias: GEFs y GAPs [63].

Existen vastas evidencias que la expresión de Rac1 correlaciona con el grado histológico de tumores mamarios. Uno de los primeros trabajos publicados en este sentido, muestra esta correlación en 50 muestras de cáncer mamario [131]. Posteriormente, se demostró que en 399 especímenes niveles altos de expresión de la relación Rac1/Cdc42 correlacionan significativamente con la estadificación del tumor, el índice proliferativo (Ki67), metástasis en nódulos linfáticos, invasión tumoral y expresión baja de ER [151]. Otros estudios muestran que los tumores expresan niveles más altos de Rac1 que el tejido circundante [83, 134].

La validación de Rac1 como blanco en cáncer proviene de numerosos estudios publicados. En nuestro laboratorio, se describió previamente que la expresión del dominio catalítico de beta2-quimerina, una proteína con actividad

Rac1-GAP, en células de carcinoma mamario F3II afectó marcadamente la proliferación, migración, invasión y metástasis. Más aún, la inhibición de la vía de señalización de Rac1 a través de la expresión de beta2-quimerina afectó la diseminación metastásica de células de carcinoma mamario *in vivo* [102].

Actualmente la terapéutica del cáncer mamario se basa en cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y terapias dirigidas, dependiendo del tipo tumoral que presenta la paciente. Si bien varias de estas estrategias son exitosas en la clínica, aquellas pacientes que presentan la enfermedad más agresiva y metastásica (10-15% de los tumores) tienen posibilidades terapéuticas limitadas. Por otro lado, una proporción de las pacientes que responden inicialmente a terapias dirigidas o antihormonales se vuelven resistentes en el tiempo. En este sentido, se propone desarrollar terapias novedosas que permitan mejorar el manejo terapéutico de la enfermedad, utilizando a Rac1 como blanco molecular.

En este trabajo se llevó adelante un proyecto de diseño de drogas (ver figura final) contra Rac1 como blanco específico utilizando una estrategia de *screening* virtual basado en *docking*. Por un lado, se utilizó la estructura tridimensional de la proteína Rac1 como blanco y por otro se eligió un subset de moléculas "drug-like" de la base de datos libre ZINC, ya que contiene compuestos comercialmente disponibles. Utilizando el software eHITs se llevó adelante el *screening* virtual con el objetivo de identificar compuestos que pudieran unirse con afinidad a la superficie de Rac1 que contentiene el aminoácido clave (Trp56) para la interacción con sus activadores tipo GEF.

Es interesante mencionar que tanto en pacientes como en líneas celulares de carcinoma mamario se describió la expresión de una variante de *splicing* de Rac1, denominada Rac1b [83, 152, 153]. Esta variante de Rac1 presenta una actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina exacerbada y GEFs como

Tiam1 y Vav2 no regulan esta actividad [154]. Es por esto, que utilizando esta estrategia de inhibición vinculada a la interacción Rac1-GEF se hipotetiza que los posibles compuestos seleccionados no presentan un efecto inhibitorio sobre esta variante de *splicing*.

Utilizando la estrategia antes descripta, se identificó al compuesto ZINC693691 con capacidad de inhibir la activación de Rac1 y de inhibir la proliferación de manera concentración-dependiente. Es decir, en este trabajo se presenta una estructura química novedosa que puede ser utilizada como compuesto líder para el desarrollo de compuestos inhibidores de Rac1.

En este trabajo se determinó que ZINC69391 es capaz de interferir la interacción de Rac1 con Tiam1 *in vitro*, mostrando que seleccionando correctamente el "hot spot" o residuo clave de cierta interacción es posible inhibir interacciones proteína-proteína utilizando pequeñas moléculas. Es importante destacar que en este caso, los experimentos *in silico* concordaron con los resultados obtenidos *in vitro*, ya que los scores calculados por el software predicen una alta afinidad de unión y esto coincide con un claro efecto *in vitro*. Este resultado resalta la potencialidad de las herramientas bioinformáticas como plataforma para el desarrollo de nuevas drogas, ya que permite realizar pesquisas de miles de compuestos en una primera etapa *in silico* y sólo avanzar con una decena de moléculas para la confirmación y validación de los hits.

Siguiendo con la validación del efecto que presenta ZINC69391 sobre células de carcinoma mamario, se determinó la actividad de este compuesto sobre la activación de Rac1. Utilizando EGF con el objetivo de activar la vía de señalización de Rac1, se observó que la presencia de ZINC69391 provocó una reducción concentración-dependiente de los niveles de Rac1-GTP. Más aún, ZINC69391 fue capaz de reducir los niveles basales de Rac1-GTP. Esta actividad es particularmente

importante en el contexto de la biología tumoral, donde un inhibidor debe ser efectivo en la modulación de una vía constitutivamente hiperactivada.

Si bien Cdc42 y Rac1 comparten un 70% de la homología estructural, cada uno de estas proteínas presentan activadores y efectores específicos. A pesar de esta homología alta, no se conserva el Trp56 clave en la interacción de Rac1 con sus activadores, sino que Cdc42 contiene un residuo de fenilalanina en esta posición [73]. Es por esto, que se determinó el efecto de ZINC69391 sobre la activación de Cdc42, donde se observa que el inhibidor no afecta los niveles de activación de Cdc42 en concentraciones donde los niveles de Rac1 se ven claramente afectados. Este resultado, no solo demuestra que ZINC69391 es un inhibidor específico de la GTPasa Rac1, sin afectar la actividad de la GTPasa íntimamente relacionada Cdc42, sino que también pone de manifiesto que la presencia del Trp56 en dicha posición es determinante para la actividad del inhibidor.

Una vez determinado el efecto de ZINC69391 a nivel molecular, se llevaron a cabo ensayos biológicos con el objetivo de evaluar el efecto de Rac1 sobre eventos celulares en donde Rac1 cumple un rol regulador importante. ZINC69391 presentó un efecto antiproliferativo concentración-dependiente en diferentes líneas de cáncer mamario donde Rac1 es relevante [73, 102, 155]. Este efecto se determinó utilizando el método indirecto de MTT. Se pudo determinar que este efecto antiproliferativo se debió en parte a un arresto significativo del ciclo celular en la fase G1. Estos resultados coinciden con trabajos en donde utilizando estrategias de sobreexpresión del RacGAP β2-quimerina se logra inhibir a Rac1 y provocar arresto del ciclo celular en modelos de cáncer mamario. Más aún, la modulación de Rac1 afecta directamente la expresión de ciclina D1 en estas líneas celulares, reduciendo la capacidad proliferativa de las células [155]. En nuestro caso, logramos reproducir estos resultados utilizando una estrategia farmacológica, al utilizar a ZINC69391.

Debido a que las Rho GTPasas y en particular Rac1 están asociadas fuertemente a la regulación de la remodelación del citoesqueleto de actina y de la migración celular. El fenómeno de migración implica una fina regulación de coordinación y dinámica del citoesqueleto de actina. El inicio de la migración requiere de una rápida reorganización de actina en el frente de la célula, formando lamelipodios y ondulaciones de membrana, las cuales son imprescindibles para la migración celular. La activación espacio-temporal de Rac1 induce la formación de lamelipodios y ondulaciones de membrana, mientras que la expresión de dominantes negativos de Rac1 inhibe la reorganización del citoesqueleto de actina tras la activación de diferentes receptores de membrana [139]. Particularmente, en líneas de carcinoma mamario se reportó que la expresión de una versión dominante activa de Rac1 provoca un aumento en la capacidad migratoria e invasiva, mientras que la inhibición de Rac1 atenúa la motilidad celular [156, 157]. Estos datos previos se encuentran en línea con los resultados obtenidos en este trabajo, donde ZINC69391 fue capaz de inhibir la reorganización del citoesqueleto de actina y así disminuir significativamente la capacidad migratoria de células F3II y MDA-MB-231.

La reorganización del citoesqueleto de actina y la migración son eventos centrales en la regulación de la invasión y metástasis. Tal como es de esperar, el papel que cumple en estos eventos Rac1 es central. Estudios *in vitro* muestran que el aumento de activación de Rac1 correlaciona directamente con el aumento del potencial metastásico en un panel de variantes celulares derivadas de la línea MDA-MB-435 [156, 157]. Por este motivo, se evaluó la capacidad antimetastásica *in vivo* de ZINC693914 utilizando un modelo murino singénico de metástasis experimental, el cual consiste inyectar células viables por la vena lateral de la cola y luego contabilizar los nódulos formados en el pulmón de los animales. Si bien este modelo de metástasis no permite determinar el efecto de la droga en los pasos

tempranos del proceso metastásico, es un modelo muy utilizando para estudiar la capacidad de células cancerosas de formar nódulos secundarios. Nuestros resultados muestran que el tratamiento diario con ZINC69391 a una dosis de 25 mg/kg/día reduce significativamente la colonización pulmonar resultando un 60% menos de nódulos totales formados. Este resultado muestra por primera vez que un inhibidor farmacológico de Rac1 es capaz de reducir significativamente la metástasis pulmonar de células de carcinoma mamario agresivo utilizando un esquema terapéutico relevante.

Utilizando la estructura de ZINC69391 como compuesto líder se diseñaron y sintetizaron una serie de análogos con el objetivo de optimizar la potencia y la selectividad. El análogo 1A-116 fue el candidato elegido debido a que sus *scores* de *docking* correlacionaron con una actividad inhibitoria *in vitro* más potente que el compuesto parental.

En este escenario, es importante determinar el efecto específico del nuevo análogo sobre la interacción Rac1-GEF. Si bien el *screening virtual* se llevó adelante utilizando la estructura de Rac1 interaccionando con los dominios DH-PH de Tiam1, es de gran interés determinar la capacidad inhibitoria de esta molécula en diferentes interacciones de Rac1-GEF. En los últimos años, se evidenció que existen ciertos GEFs preponderantes en cada tipo tumoral y estas proteínas relevantes son las que, través de la activación de Rac1, determinan la progresión maligna mediada por esta vía de señalización.

En el caso del cáncer mamario, en los últimos años se determinó la importancia del RacGEF P-Rex1, ya que está asociada fuertemente con la invasión y metástasis en cáncer mamario [158]. La expresión de P-Rex1 se correlaciona con un mal pronóstico para los pacientes y la reducción de la expresión de P-Rex1 restringe la proliferación y la diseminación metastásica [94, 158]. En este trabajo se

demuestra que el análogo 1A-116 es capaz de inhibir la interacción de Rac1-P-Rex1, potencialmente inhibiendo diferentes funciones mediadas por señalización vía P-Rex1, tales como proliferación, migración e invasión. Diferentes autores sostienen que el eje P-Rex1-Rac1 es un blanco atractivo para intervenir terapéuticamente, particularmente en pacientes con tumores ER positivos que desarrollan resistencias a terapias antiestrogénicas, ya que se demostró que Rac1 es un mediador importante en este tipo de resistencias en células MCF7 [94, 159].

En línea con resultados obtenidos con ZINC69391, el análogo 1A-116 también presentó un efecto antiproliferativo y este análogo mostró ser más potente que el compuesto parental presentando una IC₅₀ hasta 15 veces menor, dependiendo del modelo estudiado. Con el objetivo de determinar si la actividad antiproliferativa de 1A-116 está mediada por la inhibición de Rac1, se llevó acabo un ensayo de proliferación celular en un modelo de sobreexpresión de la versión constitutivamente activa de Rac1, denominada Rac1-G12V. Esta variante activa es independiente de la modulación de los GEFs y la vía de Rac1 se encuentra sobreactivada. Es por esto, que los inhibidores de Rac1 acá mencionados no deberían presentar efecto en este modelo. Tal como era esperado, 1A-116 no tuvo efecto sobre la capacidad proliferativa de células de carcinoma mamario con la vía de Rac1 constitutivamente activa. Esto evidencia que el efecto antiproliferativo de 1A-116 está relacionado con la modulación de la vía con Rac1.

Es importante destacar que concentraciones bajas de 1A-116 (tales como 1 y μ M) provocaron la reducción de los niveles de Rac1-GTP sin afectar la especificidad, ya que los niveles de Cdc42-GTP no se vieron afectados.

Por último se determinó el afecto del análogo 1A-116 sobre la progresión tumoral *in vivo*. En primer lugar, se repitió el ensayo de metástasis experimental utilizando el mismo esquema de tratamiento y utilizando una dosis de 3 mg/kg/día.

Estos ensayos mostraron la correlación del aumento de potencia *in vitro* e *in vivo*, ya que el tratamiento con el análogo 1A-116 a una dosis 8 veces menor resultó en una disminución de la colonización pulmonar similar a la observada para el compuesto parental ZINC69391.

También se realizó un ensayo de progresión tumoral *in vivo*, donde el tratamiento tanto con ZINC69391 como 1A-116 provocó una reducción del volumen tumoral al final del protocolo. Si bien, entre los dos tratamientos no se observaron diferencias en cuando al volumen tumoral final, si se observó una diferencia significativa en la tasa de crecimiento tumoral. Más aún, es importante resaltar que esta diferencia se obtuvo utilizando una dosis 7 veces menor del análogo 1A-116 con respecto al compuesto parental.

En la terapéutica de cáncer mamario, se identifican como problemáticas actuales la resistencia a quimioterapia, terapias hormonales y terapias dirigidas, así como también el tratamiento de tumores mamarios triple negativos. Es interesante resaltar que diferentes evidencias vinculan a la vía de Rac1 con mecanismos de resistencia a diferentes drogas, tanto en cáncer mamario como en otros tipos tumorales. Con respecto a resistencia a terapias antihormonales, Rac1 es fundamental para la resistencia a fulvestrant, un antagonista de ER, [160] y esta vía de señalización que incluye al efector Pak1 resultan blancos interesantes para el manejo terapéutico de estos tumores resistentes [159, 161]. Por otro lado, la vía de Rac1 está vinculada con resistencia a terapias dirigidas, como por ejemplo a tratuzumab, un anticuerpo anti HER2 [162, 163]. En este caso, si bien esta terapia presenta una respuesta terapéutica beneficiosa en pacientes con tumores HER2+, muchos de ellos responden inicialmente pero en el plazo de un año adquieren resistencia a esta terapia. La marcación positiva para Rac1 en muestras de pacientes con tumores HER2+ puede ser asociado significativamente con un

fracaso temprano a la terapia adyuvante con trastuzumab [164]. En este contexto, Rac1 se muestra como un blanco interesante para superar la resistencia adquirida a trastuzumab, sugiriendo esquemas terapéuticos de combinación.

En este sentido, ensayos de combinación de los inhibidores ZINC69391 y el análogo 1A-116 con terapias establecidas, tales como drogas antihormonales como Tamoxifeno y Fulvestrant o terapias anti HER2 como trastuzumab, son escenarios que se comenzarán a explorar para delinear esquemas de tratamiento relevantes para futuras aplicaciones clínicas.

Otro de los escenarios posibles es la administración de los inhibidores de Rac1 de manera concomitante con radiación ionizante, la cual desencadena daño en el ADN. En este sentido, la inhibición de Rac1 sensibiliza a células de carcinoma mamario irradiadas. Se sugiere que esta sensibilización se da porque Rac1 promueve la supervivencia de las células post-radiación ionizante, y al inhibir a esta proteína se gatilla la muerte celular [165]. La radiación ionizante resulta en la activación de diferentes miembros de la familia de las MAPK, incluyendo a Erk1/2, JNK y p38 [166] y particularmente Rac1 es un mediador de respuestas a agentes genotóxicos activando quinasas de stress, incluyendo a SAPK/JNK y p38, y factores de transcripción, como AP-1 y NFKB [72]. Por otro lado, recientemente se demostró que Rac1 presenta un rol nuclear importante en la respuesta a daño a ADN provocado por antraciclinas (ej. doxorrubicina) y otros tipos de drogas quimioterapéuticas como etopósido. Estas drogas tienen como blanco principal la toposiomerasa II y la vía de señalización de Rac1 aumenta la interacción de esta enzima con las drogas, mediando al menos en parte la respuesta al daño al ADN. Es por esto, que se postula la utilización de inhibidores de Rac1 para disminuir la alta toxicidad (ej. cardiotoxicidad) asociada a los tratamientos con doxorrubicina, potenciando el efecto antitumoral [72].

Por todo esto, se llevará adelante un estudio detallado de combinaciones con diferentes estrategias terapéuticas establecidas con el objetivo de determinar la ventana terapéutica más óptima para la utilización de estos inhibidores de Rac1 en el tratamiento del carcinoma mamario refractario.

Desarrollo de nuevos inhibidores de Rac1 en un modelo de glioblastoma multiforme humano

Existen varios estudios que muestran que la actividad desregulada de las Rho GTPasas, como Rac1, en glioblastomas son responsables del fenotipo altamente invasivo e infiltrativo de estos tumores cerebrales [148, 167-169]. A pesar que no se encontraron mutaciones en el gen rac1, los niveles de expresión de Rac1 correlacionan con grado tumoral y corta sobrevida en pacientes con glioblastoma [98]. Adicionalmente, análisis inmunohistoquímicos muestran una marca prominente de Rac1 en la membrana plasmática en muestras de glioblastoma de alto grado, indicando un alto grado de activación de estas proteínas. Esta hiperactivación puede ser explicada, en parte, por la sobreexpresión de diferentes GEFs, tales como Trio, Ect2, Vav3, Dock-180, entre otros [98].

Debido a que Rac1 juega un rol fundamental en la migración e invasión celular y los gliomas presentan como mayor desafío terapéutico su naturaleza infiltrativa, regulada en parte por la expresión de diferentes activadores tipo GEFs, la activación de Rac1 se presenta como un blanco interesante para el desarrollo de nuevas terapias para gliomas malignos. Por ello, se evaluaron tanto el compuesto parental ZINC69391 como su análogo 1A-116 en un modelo de glioblastoma humano *in vitro* e *in vivo* (ver figura final).

Debido a que ZINC69391 fue identificado como un inhibidor con afinidad de unión al residuo Trp56, se esperaba que este compuesto fuera capaz de interferir la interacción de Rac1 con aquellos GEFs que compartieran este mecanismo de activación. Al comienzo, determinamos que ZINC69391 y 1A-116 fueron capaces de interferir la interacción de Rac1 con Tiam1 y P-Rex1 respectivamente, dos GEFs relevantes en cáncer mamario pertenecientes a la familia clásica Dbl.

Recientemente, se determinó que el residuo Trp56 también resulta importante para la especificidad de la interacción de Rac1 con Dock-180, miembro de la familia Dock de GEFs. En este trabajo se muestra que ZINC69391 es capaz de interferir la interacción de Rac1 con Dock-180. Es particularmente interesante el rol propuesto para este GEF en glioma, ya que contribuye de manera pivotal en la migración e invasión de las células de glioma a través de la activación de Rac1 [99, 170]. Análisis de muestras de pacientes mediante técnicas de inmunohistoquímica mostraron que Dock-180 se expresa diferencialmente en células tumorales infiltrativas en las áreas invasivas y bordes tumorales con respecto al centro del glioma, independientemente del grado tumoral. Esta marca no se observó en tejido normal cerebral [99]. Este patrón de expresión puede traer asociado importantes implicancias terapéuticas, ya que todos los gliomas se caracterizan por invadir difusamente, incluyendo astrocitomas de grado bajo [42]. Es por esto, que se postula que Dock-180 podría estar implicado en estadios tempranos del desarrollo de la enfermedad, regulando la naturaleza infiltrativa difusa de los gliomas. Más aún, diferentes trabajos muestran que Dock-180 es un nodo importante en la vía de señalización que regula la progresión tumoral e invasión mediadas por PDGFR y EGFRVIII en gliomas, a través de la activación de Rac1 [170-172]. Tal como se explicó anteriormente, la mayoría de los gliomas presentan mutaciones y/o amplificaciones de receptores tirosina-quinasa, siendo los más prevalentes las mutaciones/amplificaciones de EGFR (40-50%) y PDGFR (15%) [173].

En línea con este resultado, ZINC69391 también fue capaz de reducir los niveles de activación de Rac1 de manera concentración-dependiente en respuesta a estimulación con EGF. Las células de glioma tratadas con ZINC69391 y estimuladas con EGF mostraron niveles de Rac-GTP iguales o menores que la condición sin estimular. Este mismo efecto se observó sobre los niveles de fosforilación de Pak1, un efector directo de Rac1. Pak1 es una proteína quinasa de

serina/treonina que regula la reorganización del citoesqueleto y la migración celular a través de la modulación de actina y microtúbulos [174]. Pak1 se expresa en varios tejidos diferentes y su expresión se encuentra significativamente aumentada en diferentes tipos de cáncer [175]. En muestras de glioblastomas, análisis inmunohistoquímicos mostraron que los niveles de fosforilación de Pak1 en el citoplasma celular correlacionan con una sobrevida más corta en pacientes [143]. Los resultados mostrados en este trabajo indican que el tratamiento con ZINC69391 de células LN229 reduce la fosforilación de Pak1 de manera concentración dependiente en respuesta a EGF. En resumen, se muestra que ZINC69391 inhibe la vía Dock-180-Rac1-Pak1 en células de glioma *in vitro*.

Una vez determinado el efecto de ZINC69391 sobre la vía de señalización de Rac1 se evaluó el desempeño de dicho compuesto sobre eventos celulares en los cuales Rac1 se encuentra involucrado. En primer lugar se determinó el efecto de ZINC69391 sobre la proliferación celular. El efecto antiproliferativo que se muestra tras el tratamiento con ZINC69391 de células LN229 y U-87 MG se encuentra en línea con trabajos en donde la expresión de dominantes negativos de Rac1 en líneas celulares de glioma inhibe la proliferación y sobrevida [147, 148]. Esta inhibición de la proliferación está asociada, al menos en parte, en un arresto del ciclo celular en fase G1. Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que en muchos tipos celulares Rac1 regula la progresión del ciclo celular a través de la fase G0/G1 modulando los niveles de expresión de ciclina D1 [69].

Por otro lado, el aumento de la población subG0 tras el tratamiento con ZINC69391 sugiere inducción de apoptosis. Con el objetivo de estudiar en detalle este fenómeno, se evaluó la actividad proapoptótica de ZINC69391 sobre células de glioblastoma humano LN229. La evaluación de la apoptosis se llevó a cabo mediante la técnica de AnexinaV y de TUNEL. En ambos casos se observó que el

tratamiento con 10 y 50 µM induce apoptosis en células de glioma. Previamente, se había descripto que la inhibición de la actividad de Rac1 en líneas celulares y en cultivos primarios de pacientes mediante la utilización de vectores adenovirales expresando un dominante negativo de Rac1 inducía apoptosis, mientras que este efecto no se observaba en astrocitos normales humanos [147]. Este dato, da un contexto racional para la utilización de Rac1 como blanco molecular en gliomas malignos presentando un efecto selectivo en el tumor. La vía apoptótica desencadenada por el tratamiento con ZINC69391 en células de glioma aún es desconocida. Sin embargo, se describió la participación de la via Pak1-JNK como una de las vías dominantes en las señales de sobrevida mediadas por Rac1 en células de glioma [147]. Si bien en esta tesis se mostró un efecto directo de Rac1 sobre la fosforilación de Pak1, falta aún evaluar si este compuesto es capaz de modular la actividad de JNK.

Como se describió anteriormente, la migración e invasión difusas son propiedades claves que presentan los gliomas. Este comportamiento invasivo tiene una gran implicancia terapéutica, ya que es la característica clave que determina la recurrencia del glioma y el fracaso terapéutico [42]. La cirugía es incapaz de curar pacientes, aun cuando las lesiones se encuentran en zonas donde la resección quirúrgica aparentemente completa es posible, ya que las células de gliomas se encuentran infiltradas en el tejido circundante. Por otro lado, diferentes estudios muestran que la radiación ionizante puede aumentar la capacidad migratoria de las células tumorales de glioma [176, 177]. A su vez, la invasión tumoral y la resistencia a drogas se consideran como procesos interconectados que promueven la progresión tumoral y el fracaso terapéutico [141]. En este sentido, Rac1 y las Rho GTPasas en general son conocidos moduladores de la migración celular en tejidos normales y en diferente patologías [139]. Particularmente en glioblastomas, se estudió la regulación espacial de la actividad de las Rho GTPasas utilizando

biosensores y sustratos 3D. En ambos modelos, las células de glioblastoma que lideran el frente de invasión presentaron mayor actividad de Rac1 y Cdc42, guiando a las células de glioma menos invasivas con niveles de activación de Rac1 y Cdc42 menores [178]. Este patrón de activación muestra una capacidad invasiva heterogénea en diferentes poblaciones celulares dentro del mismo tumor. Adicionalmente, se describió la participación de diferentes GEFs en la regulación de la migración de células de glioma, tales como Ect2, Vav3, Trio y Dock-180 [172, 179]. Estas evidencias indican que la vía de señalización de Rac1 es relevante para la modulación de la migración en células de glioma.

El tratamiento con ZINC69391 sobre células LN229 inhibe la reorganización del citoesqueleto de actina, mostrando una inhibición significativa de la migración e invasión celular. Estos datos concuerdan con lo esperado, ya que la utilización de versiones dominantes negativas de Rac1 y de ARN interferencia reducen la capacidad invasiva de células de glioma. Utilizando estas herramientas moleculares se logra una inhibición del 80% de la invasión [148], mientras que los datos que se muestran en este trabajo indican que el tratamiento con ZINC69391, un inhibidor farmacológico, provoca la inhibición del 50%, 60% y 85% utilizando concentraciones de 10, 50 y 100 μM respectivamente.

Posteriormente, el objetivo fue establecer un modelo de glioblastoma ortotópico *in vivo* para la evaluación de los inhibidores desarrollados. El establecimiento de este modelo es particularmente importante en este tipo de tumor, ya que el cerebro provee un microambiente único comparado con los modelos subcutáneos utilizados. Kamphausen *et al* describieron como el modelo utilizado afecta drásticamente la biología de los gliomas, indicando la importancia de los modelos ortotópicos intracraneales para definir efectos sobre blancos moleculares [180]. Para avanzar en este aspecto, se estableció un modelo

ortotópico intracraneal xenogénico utilizando la línea celular LN229 en ratones atímicos. Los resultados que se muestran en este trabajo indican que ZINC69391 presenta un efecto significativo sobre la sobrevida de los animales operados e inoculados con células de glioma, logrando un incremento de 23 días en las medianas de sobrevida, lo que significa un aumento del 50% de la sobrevida de los animales.

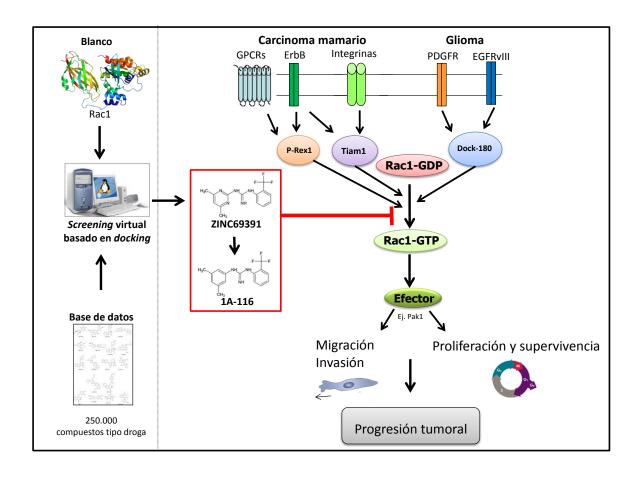
Es importante resaltar que uno de los mayores inconvenientes en el desarrollo de terapias dirigidas al cerebro es la capacidad de las moléculas de traspasar la barrera hemato-encefálica. De manera general, las pequeñas moléculas que cruzan la barrera en cantidades farmacológicamente relevantes presentan dos propiedades: 1- el peso molecular de la droga es menor a los 400-500 Da y 2- la droga forma menos de 8-10 uniones puente de hidrógeno con el agua como solvente [181]. En el caso de ZINC69391 presenta un peso molecular de 310 Da y se predice la presencia de 4 donores y 5 aceptores de puentes de hidrógeno. Teóricamente cumple con las condiciones antes enumeradas y, por otro lado, presentó un efecto significativo sobre la sobrevida. Esto sugeriría que ZINC69391 es capaz de pasar la barrera hemato-encefálica, pero es necesario evaluar este evento en detalle, para poder determinar la capacidad de cruzar la barrera y conocer cuál es la concentración efectiva que estaría llegando a este compartimento tisular.

Con respecto a la evaluación del análogo 1A-116, este compuesto mostró ser más potente que el compuesto parental en líneas de glioblastoma humano. 1A-116 presentó una mayor actividad antiproliferativa que el compuesto parental. Más aún, esta actividad antiproliferativa es Rac1 dependiente, ya que el silenciamiento con ARN de interferencia atenuó el efecto antiproliferativo de 1A-116. Es decir, que complementando los datos obtenidos en el modelo de carcinoma

mamario utilizando la versión constitutivamente activa de Rac1 G12V, el efecto del análogo 1A-116 está mediado por la presencia de Rac1 con capacidad de ser modulado por sus activadores tipo GEFs. Además de presentar un efecto antiproliferativo potenciado, también se observa que 1A-116 muestra una mayor capacidad antiinvasiva que el compuesto parental.

Los resultados que se muestran en este trabajo indican que los inhibidores de Rac1 ZINC69391 y el análogo 1A-116, presentan un efecto antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de glioblastoma humano. Debido a las pocas opciones terapéuticas disponibles y sin disponer de terapias efectivas a largo plazo, los siguientes pasos son establecer los esquemas de combinación más efectivos con quimioterapia como temozolomida, radioterapia y otras estrategias de blanco molecular como inhibidores de EGFR o inhibidores de la angiogénesis como bevacizumab.

Vastas evidencias postulan la relevancia de Rac1 como blanco molecular en múltiples escenarios terapéuticos. Los resultados de la evaluación preclínica de los inhibidores ZINC69391 y el análogo 1A-116 aquí mostrados, aportan evidencia sólida para continuar su desarrollo hacia futuras etapas clínicas.



Desarrollo de inhibidores de Rac1 como estrategia antitumoral. A través de un screening virtual basado en docking se identificaron inhibidores específicos de Rac1. Diferentes receptores de membrana provocan la activación de Rac1 a través de los GEFs, los cuales presentan un rol relevante en diferentes tipos tumorales. Esta vía modula la migración, invasión, proliferación y supervivencia, eventos celulares claves para la progresión tumoral. La utilización de inhibidores de la activación de Rac1 se presenta como una estrategia terapéutica interesante para el manejo de diferentes tipos tumorales, como el carcinoma mamario y el glioblastoma.

Y sí, finalmente llegamos al último pedacito de la tesis. Muchas veces es lo primero que se lee (o al menos eso es lo que pasa en el lab!) y es la parte que más me costó escribir. Es muy difícil resumir en dos carillas a las personas que estuvieron involucradas en esta tesis directa o indirectamente y me acompañaron en este camino de convertirme en doctora.

Primero quiero agradecer a todos los que forman el Laboratorio de Oncología Molecular. Es un privilegio ser parte de este grupo y poder llegar todas las mañanas a un lugar con ganas. Las risas, asados, comidas, mates, días playeros que compartimos son realmente un gusto. Y ahora vamos con los agradecimientos particulares...

En primer lugar, quiero agradecer especialmente a los Dres. Daniel Gomez y Daniel Alonso. Ellos me permitieron comenzar en este camino de la investigación abriéndome las puertas a LOM. Me enseñaron y me siguen enseñando muchísimo. Gracias por el aliento cuando se hacía cuesta arriba con los reviewers y por mantener esa mirada positiva cuando parecía imposible.

A Pablo, por todo. Por tus charlas, por tu confianza, por tu apoyo, por enseñarme todo de manera desinteresada, por mostrarme que las cosas se pueden pensar de mil formas y por darme libertad y consejo para trabajar. Me encanta la idea de poder seguir trabajando con vos, y espero que sea por mucho tiempo más! (aunque esto implique cada vez más lectura de pensamientos)

A Gi, por estar siempre. Gracias por la paciencia de siempre y por poder compartir tantas cosas con vos. Es muy genial saber que estas siempre para todo!

A Hernan, por ser ese tío Farina con tanto empuje y que tanto me enseña en un plano nuevísimo para mí. Gracias por la oportunidad de ser parte de este crecimiento de LOM.

A Marian, por sus charlas y por su confianza. También te agradezco por tenerme en cuenta siempre.

A Vale, mi amiga desde el primer momento que entre en el laboratorio. Tus ganas de ayudar, de estar siempre y de darte cuenta de todo. Es increíble! Parece que nos conociéramos hace mil años. (y qué suerte que vamos a poder trabajar juntas mucho más!) Gracias Valita!

A Carli, también conocida como Carlox, mi amiguita de LOM. Gracias por ser una persona en quien puedo confiar plenamente, por sacarme una risa en el momento inesperado y por ayudarme todas las veces.

A Naza, mi hermano de línea, por compartir conmigo todo lo bueno y todo lo malo, los fines de semana de inyección (porque para todos los que no leyeron la tesis pero sí los agradecimientos: en todos los *in viv*o las dosis fueron <u>diarias</u>, incluyendo fines de semana! jaja) y por tus ganas de trabajar y seguir adelante. Contenta de saber que muchas cosas geniales vendrán.

A Mari, por ser genial y tan transparente. Sos un ejemplo Mari. Pocas personas que conozco son tan consecuentes en su forma de hablar y su forma de actuar. Me alegra montones poder charlar con vos y espero que sigamos teniendo nuestras charlas por mucho tiempo más!

A Diego, la incorporación más genial que hubiese podido esperar. Gracias Die! Me ayudaste siempre, porque sin ser LOM 100%, sabes que siempre fuiste LOM un poquito y ahora completaste tu pertenencia. Espero que podamos seguir compartiendo mil momentos, charlas y mates.

A Romein, la persona con más predisposición que conozco en el mundo. Romein, sin vos esto no sería igual. Tan genial tu buena onda, tu dulzura y tus cantitos. Me alegro montones de que estés aca!

A Maru, con su locura y sus ocurrencias. Me haces reír cantidad y me alegro que podamos compartir este tiempo en el lab.

A Hec. No se equivocaron cuando me dijeron que "ponían las manos en el fuego" por vos. jajaja. Sos genial Hep, combinación perfecta de bicis con comidas y buena onda. Espero que podamos seguir trabajando juntos por mucho tiempo más!

A Fer, sobre todo al principio cuando nos veíamos más, por las risas y la buena onda. A quienes estuvieron en una parte de mi camino doctoral y ya no están en LOM: Pochi, Mai y particularmente Lau, quien estuvo durante casi todo este tiempo. Por tus risas y tus canticos que se extrañan.

A mis amigos de Crono que me ayudaron siempre. En particular a Jose, por su paciencia, su buena onda y su transmisión de tranquilidad en momentos en donde las cirugías intracraneales parecían el Everest. Gracias por todo!

A la Dra. Julieta Comin, al Lic. Eduardo Spitzer y al Dr. Adrian Turjanski por su colaboración en este trabajo.

A mis amigas queridas que fui conociendo en diferentes momentos. A Ceci, por estar siempre: momentos difíciles y momentos geniales. Por ayudarme cada vez que pudiste en mil cosas y por ayudarme también en experimentos (por tener la suerte que mi amiga es campeona de la biología molecular). A Carolita, mi amiga neurocientífica. Gracias Carola por estar siempre, por tantas risas y por entender siempre todo. A Juli, mi amiga desde los 4 años que siempre intenta entender lo que hago. Siempre lista para todo e incondicional. Te quiero Jules! A Ana y Barbi, mis amigas de toda la vida, por haber compartido todas las etapas y estar siempre.

A mi gran familia. A mis Papas. Siempre un ejemplo de perseverancia, trabajo, honestidad y determinación. Gracias por confiar en mí, darme herramientas y dejarme elegir siempre. Son mi ejemplo. A mis cuatro abuelos, que siempre estuvieron alentándome, enseñándome y mostrando como se pueden lograr lo que uno se propone. A Nana y Juli, mis hermanas. Por interesarse, por estar y acompañarme y también por

reírse conmigo. A Gashto y Fede, por sumar siempre y ser parte de esta familia. A mis tíos y primos (casi hermanos).

A Juancho, a quién encontré un día sentado en frente mío y me acompañó durante toda esta tesis. Es invaluable estar con vos que entiendes lo que los otros no entienden y que puedas compartir este momento conmigo sabiendo exactamente lo que significa. Por esos domingos terribles que te hago venir a Quilmes, por tranquilizarme cuando por momentos me acelero y por darme una visión tan diferente de las cosas simples que complico. Gracias por mejorar siempre mis días.

Muchísimas gracias a todos! Un momento esperadísimo que lo comencé a disfrutar desde la primera línea que escribí de esta tesis y motivada por todo lo que queda por hacer...

- 1. DeVita VT, Jr., Chu E: **A history of cancer chemotherapy**. *Cancer research* 2008, **68**(21):8643-8653.
- 2. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
- 3. Hoelder S, Clarke PA, Workman P: **Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities**. *Molecular oncology* 2012, **6**(2):155-176.
- 4. Bunnage ME: **Getting pharmaceutical R&D back on target**. *Nature chemical biology* 2011, **7**(6):335-339.
- 5. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL: **Principles of early drug discovery**. *British journal of pharmacology* 2011, **162**(6):1239-1249.
- 6. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW: **Cancer genome landscapes**. *Science* 2013, **339**(6127):1546-1558.
- 7. Workman P, Al-Lazikani B: **Drugging cancer genomes**. *Nature reviews Drug discovery* 2013, **12**(12):889-890.
- 8. Weinstein IB: Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* 2000, **21**(5):857-864.
- 9. Torti D, Trusolino L: **Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti- cancer therapy: promises and perils**. *EMBO molecular medicine* 2011, **3**(11):623-636.
- 10. Kaelin WG, Jr.: The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(9):689-698.
- 11. Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, Rayter S, Tutt AN, Ashworth A: A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *The EMBO journal* 2008, **27**(9):1368-1377.
- 12. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK *et al*: **Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial**. *Lancet* 2010, **376**(9737):235-244.
- 13. Keller TH, Pichota A, Yin Z: **A practical view of 'druggability'**. *Current opinion in chemical biology* 2006, **10**(4):357-361.
- 14. Hopkins AL, Groom CR: **The druggable genome**. *Nature reviews Drug discovery* 2002, **1**(9):727-730.
- 15. 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):842-857.
- 16. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: **Experimental and computational** approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews* 2001, **46**(1-3):3-26.
- 17. Verdine GL, Walensky LD: **The challenge of drugging undruggable targets in cancer: lessons learned from targeting BCL-2 family members**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007, **13**(24):7264-7270.
- 18. Wilson AJ: **Inhibition of protein-protein interactions using designed molecules**. *Chemical Society reviews* 2009, **38**(12):3289-3300.
- 19. Wells JA, McClendon CL: **Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces**. *Nature* 2007, **450**(7172):1001-1009.
- 20. Arkin MR, Wells JA: **Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream**. *Nature reviews Drug discovery* 2004, **3**(4):301-317.
- 21. Gonzalez AZ, Eksterowics J, Bartberger MD, Beck HP, Canon J, Chen A, Chow D, Duquette J, Fox BM, Fu J *et al*: **Selective and Potent Morpholinone Inhibitors of the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction**. *Journal of medicinal chemistry* 2014.

- 22. Ferrari S, Pellati F, Costi M: **Protein–Protein Interaction Inhibitors: Case Studies on Small Molecules and Natural Compounds**. In: *Disruption of Protein-Protein Interfaces.* edn. Edited by Mangani S. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013: 31-60.
- 23. Mullard A: **Protein-protein interaction inhibitors get into the groove**. *Nature reviews Drug discovery* 2012, **11**(3):173-175.
- 24. Bleicher KH, Bohm HJ, Muller K, Alanine AI: **Hit and lead generation: beyond high-throughput screening**. *Nature reviews Drug discovery* 2003, **2**(5):369-378.
- 25. Keseru GM, Makara GM: **Hit discovery and hit-to-lead approaches**. *Drug discovery today* 2006, **11**(15-16):741-748.
- 26. Macarron R, Banks MN, Bojanic D, Burns DJ, Cirovic DA, Garyantes T, Green DV, Hertzberg RP, Janzen WP, Paslay JW *et al*: **Impact of high-throughput screening in biomedical research**. *Nature reviews Drug discovery* 2011, **10**(3):188-195.
- 27. Klebe G: Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug discovery today* 2006, **11**(13-14):580-594.
- 28. Ekins S, Mestres J, Testa B: In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British journal of pharmacology* 2007, **152**(1):9-20.
- 29. Shoichet BK: Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 2004, **432**(7019):862-865.
- 30. Reddy AS, Pati SP, Kumar PP, Pradeep HN, Sastry GN: **Virtual screening in drug discovery -- a computational perspective**. *Current protein & peptide science* 2007, **8**(4):329-351.
- 31. Cavasotto CN: **Homology models in docking and high-throughput docking**. *Current topics in medicinal chemistry* 2011, **11**(12):1528-1534.
- 32. Cheng T, Li Q, Zhou Z, Wang Y, Bryant SH: **Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review**. *The AAPS journal* 2012, **14**(1):133-141.
- 33. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J: **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications**. *Nature reviews Drug discovery* 2004, **3**(11):935-949.
- 34. Fox E, Curt GA, Balis FM: **Clinical trial design for target-based therapy**. *The oncologist* 2002, **7**(5):401-409.
- 35. Yap TA, Sandhu SK, Workman P, de Bono JS: **Envisioning the future of early anticancer drug development**. *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(7):514-523.
- 36. Yap TA, Workman P: Exploiting the cancer genome: strategies for the discovery and clinical development of targeted molecular therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2012, **52**:549-573.
- 37. Katz R: **Biomarkers and surrogate markers: an FDA perspective**. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004, **1**(2):189-195.
- 38. Aronson JK: **Biomarkers and surrogate endpoints**. *British journal of clinical pharmacology* 2005, **59**(5):491-494.
- 39. Bal De Kier Joffe E, Puricelli L, Alonso D: **Biología tumoral: claves celulares y moleculares del cáncer**, 1st edn. Buenos Aires: EUDEBA; 2008.
- 40. Ferlay J, Soerjomataram I, 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]. In. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- 41. Moreno F, Dussel V, Abriata G, Loria D, Orellana L: **Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino : incidencia 2000-2009, supervivencia 2000-2007, tendencia de mortalidad 1997-2010**. Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer; 2012.

- 42. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA:

 Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & development* 2001,

 15(11):1311-1333.
- 43. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012, **490**(7418):61-70.
- 44. Banin Hirata BK, Oda JM, Losi Guembarovski R, Ariza CB, de Oliveira CE, Watanabe MA: Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior. *Disease markers* 2014, **2014**:513158.
- 45. Baird RD, Caldas C: **Genetic heterogeneity in breast cancer: the road to personalized medicine?** *BMC medicine* 2013, **11**:151.
- 46. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C: **A new genome-driven integrated** classification of breast cancer and its implications. *The EMBO journal* 2013, **32**(5):617-628.
- 47. Schnitt SJ: **Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy**. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2010, **23 Suppl 2**:S60-64.
- 48. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ: **Breast cancer metastasis: markers and models**. *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(8):591-602.
- 49. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y: **Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis**. *Cell research* 2007, **17**(1):3-14.
- 50. Gupta GP, Massague J: **Cancer metastasis: building a framework**. *Cell* 2006, **127**(4):679-695.
- 51. Akram M, Siddiqui SA: **Breast cancer management: past, present and evolving**. *Indian journal of cancer* 2012, **49**(3):277-282.
- 52. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N: **Triple-negative breast** cancer--current status and future directions. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009, **20**(12):1913-1927.
- 53. Massarweh S, Schiff R: Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocrine-related cancer* 2006, **13** Suppl 1:S15-24.
- 54. Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ: **Mechanisms of disease:** understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature clinical practice Oncology* 2006, **3**(5):269-280.
- 55. Musgrove EA, Sutherland RL: **Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer**. *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(9):631-643.
- 56. Chen J, McKay RM, Parada LF: **Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells**. *Cell* 2012, **149**(1):36-47.
- 57. Bonavia R, Inda MM, Cavenee WK, Furnari FB: **Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network**. *Cancer research* 2011, **71**(12):4055-4060.
- 58. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M: **Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment**. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003, **21**(8):1624-1636.
- 59. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, Agarwalla PK, Chheda MG, Campos B, Wang A *et al*: **Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma**. *Genes & development* 2012, **26**(8):756-784.
- 60. Wen PY, Kesari S: **Malignant gliomas in adults**. *The New England journal of medicine* 2008, **359**(5):492-507.

- 61. Tanase CP, Enciu AM, Mihai S, Neagu AI, Calenic B, Cruceru ML: **Anti-cancer Therapies in High Grade Gliomas**. *Current proteomics* 2013, **10**(3):246-260.
- 62. 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):167-180.
- 63. Ellenbroek SI, Collard JG: **Rho GTPases: functions and association with cancer**. *Clinical & experimental metastasis* 2007, **24**(8):657-672.
- 64. Boulter E, Estrach S, Garcia-Mata R, Feral CC: **Off the beaten paths: alternative and crosstalk regulation of Rho GTPases**. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2012, **26**(2):469-479.
- 65. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM: **GTP-binding proteins of the Rho/Rac family:** regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2007, **29**(4):356-370.
- 66. Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, Sakagami H, Kondo H, Nozawa S, Aiba A *et al*: **Rac1** is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 1998, **17**(26):3427-3433.
- 67. 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):401-410.
- 68. Etienne-Manneville S, Hall A: **Rho GTPases in cell biology**. *Nature* 2002, **420**(6916):629-635.
- 69. Olson MF, Ashworth A, Hall A: **An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1**. *Science* 1995, **269**(5228):1270-1272.
- 70. Hordijk PL: **Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins**. *Circulation research* 2006, **98**(4):453-462.
- 71. Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF, Ambrosio AL, Dias SM, Dang CV *et al*: **Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation**. *Cancer cell* 2010, **18**(3):207-219.
- 72. Fritz G, Kaina B: Rac1 GTPase, a multifunctional player in the regulation of genotoxic stress response. *Cell Cycle* 2013, **12**(16):2521-2522.
- 73. Snyder JT, Worthylake DK, Rossman KL, Betts L, Pruitt WM, Siderovski DP, Der CJ, Sondek J: Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors.

 Nature structural biology 2002, 9(6):468-475.
- 74. Hirshberg M, Stockley RW, Dodson G, Webb MR: **The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue**. *Nature structural biology* 1997, **4**(2):147-152.
- 75. Worthylake DK, Rossman KL, Sondek J: **Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1**. *Nature* 2000, **408**(6813):682-688.
- 76. Karnoub AE, Worthylake DK, Rossman KL, Pruitt WM, Campbell SL, Sondek J, Der CJ: Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nature structural biology* 2001, **8**(12):1037-1041.
- 77. 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):47530-47541.
- 78. Wu X, Ramachandran S, Lin MC, Cerione RA, Erickson JW: **A minimal Rac activation domain in the unconventional guanine nucleotide exchange factor Dock180**. *Biochemistry* 2011, **50**(6):1070-1080.
- 79. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M *et al*: **Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma**. *Nature genetics* 2012, **44**(9):1006-1014.

- 80. Gomez del Pulgar T, Benitah SA, Valeron PF, Espina C, Lacal JC: **Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link**. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2005, **27**(6):602-613.
- 81. 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):6443-6453.
- 82. Qiu RG, Chen J, McCormick F, Symons M: **A role for Rho in Ras transformation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(25):11781-11785.
- 83. Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel E: Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* 2000, 19(26):3013-3020.
- 84. Schmitz AA, Govek EE, Bottner B, Van Aelst L: **Rho GTPases: signaling, migration, and invasion**. *Experimental cell research* 2000, **261**(1):1-12.
- 85. Michiels F, Habets GG, Stam JC, van der Kammen RA, Collard JG: **A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion**. *Nature* 1995, **375**(6529):338-340.
- 86. Engers R, Springer E, Michiels F, Collard JG, Gabbert HE: Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(45):41889-41897.
- 87. Zhuge Y, Xu J: Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(19):16248-16256.
- 88. Lane J, Martin TA, Mansel RE, Jiang WG: The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. International seminars in surgical oncology: ISSO 2008, 5:23.
- 89. Chen B, Ding Y, Liu F, Ruan J, Guan J, Huang J, Ye X, Wang S, Zhang G, Zhang X *et al*: **Tiam1**, overexpressed in most malignancies, is a novel tumor biomarker. *Molecular medicine reports* 2012, **5**(1):48-53.
- 90. Wang S, Li S, Yang X, Yang S, Liu S, Liu B, Liu J: **Elevated expression of T-lymphoma** invasion and metastasis inducing factor 1 in squamous-cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance. *Eur J Cancer* 2014, **50**(2):379-387.
- 91. Engers R, Zwaka TP, Gohr L, Weber A, Gerharz CD, Gabbert HE: **Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas**. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2000, **88**(3):369-376.
- 92. Minard ME, Kim LS, Price JE, Gallick GE: The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. *Breast cancer research and treatment* 2004, **84**(1):21-32.
- 93. Moriarty CH, Pursell B, Mercurio AM: miR-10b targets Tiam1: implications for Rac activation and carcinoma migration. *The Journal of biological chemistry* 2010, 285(27):20541-20546.
- 94. Sosa MS, Lopez-Haber C, Yang C, Wang H, Lemmon MA, Busillo JM, Luo J, Benovic JL, Klein-Szanto A, Yagi H *et al*: **Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer**. *Molecular cell* 2010, **40**(6):877-892.
- 95. Qin J, Xie Y, Wang B, Hoshino M, Wolff DW, Zhao J, Scofield MA, Dowd FJ, Lin MF, Tu Y: Upregulation of PIP3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene* 2009, **28**(16):1853-1863.
- 96. Citterio C, Menacho-Marquez M, Garcia-Escudero R, Larive RM, Barreiro O, Sanchez-Madrid F, Paramio JM, Bustelo XR: **The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung**

- metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells. *Science signaling* 2012, 5(244):ra71.
- 97. Lin KT, Gong J, Li CF, Jang TH, Chen WL, Chen HJ, Wang LH: **Vav3-rac1 signaling regulates** prostate cancer metastasis with elevated **Vav3 expression correlating with prostate** cancer progression and posttreatment recurrence. *Cancer research* 2012, **72**(12):3000-3009.
- 98. Salhia B, Tran NL, Chan A, Wolf A, Nakada M, Rutka F, Ennis M, McDonough WS, Berens ME, Symons M *et al*: **The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma**. *The American journal of pathology* 2008, **173**(6):1828-1838.
- 99. Jarzynka MJ, Hu B, Hui KM, Bar-Joseph I, Gu W, Hirose T, Haney LB, Ravichandran KS, Nishikawa R, Cheng SY: ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion. Cancer research 2007, 67(15):7203-7211.
- 100. Laurin M, Huber J, Pelletier A, Houalla T, Park M, Fukui Y, Haibe-Kains B, Muller WJ, Cote JF: Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(18):7434-7439.
- 101. Wolf RM, Draghi N, Liang X, Dai C, Uhrbom L, Eklof C, Westermark B, Holland EC, Resh MD: p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3. *Genes & development* 2003, 17(4):476-487.
- 102. Menna PL, Skilton G, Leskow FC, Alonso DF, Gomez DE, Kazanietz MG: Inhibition of aggressiveness of metastatic mouse mammary carcinoma cells by the beta2-chimaerin GAP domain. *Cancer research* 2003, **63**(9):2284-2291.
- 103. Lerm M, Schmidt G, Aktories K: **Bacterial protein toxins targeting rho GTPases**. *FEMS microbiology letters* 2000, **188**(1):1-6.
- 104. Farina HG, Bublik DR, Alonso DF, Gomez DE: Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells. *Clinical & experimental metastasis* 2002, **19**(6):551-559.
- 105. Wang CY, Liu PY, Liao JK: **Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results.** *Trends in molecular medicine* 2008, **14**(1):37-44.
- Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R et al: CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. The Journal of clinical investigation 2003, 111(8):1133-1145.
- 107. Poppe D, Tiede I, Fritz G, Becker C, Bartsch B, Wirtz S, Strand D, Tanaka S, Galle PR, Bustelo XR *et al*: **Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins**. *J Immunol* 2006, **176**(1):640-651.
- 108. Menna PL, Parera RL, Cardama GA, Alonso DF, Gomez DE, Farina HG: Enhanced cytostatic activity of statins in mouse mammary carcinoma cells overexpressing beta2-chimaerin. *Molecular medicine reports* 2009, **2**(1):97-102.
- 109. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y: **Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(20):7618-7623.

- 110. Ferri N, Corsini A, Bottino P, Clerici F, Contini A: **Virtual screening approach for the identification of new Rac1 inhibitors**. *Journal of medicinal chemistry* 2009, **52**(14):4087-4090.
- 111. 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):348-356.
- 112. Montalvo-Ortiz BL, Castillo-Pichardo L, Hernandez E, Humphries-Bickley T, De la Mota-Peynado A, Cubano LA, Vlaar CP, Dharmawardhane S: **Characterization of EHop-016, novel small molecule inhibitor of Rac GTPase**. *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(16):13228-13238.
- 113. Vives V, Laurin M, Cres G, Larrousse P, Morichaud Z, Noel D, Cote JF, Blangy A: **The Rac1 exchange factor Dock5 is essential for bone resorption by osteoclasts**. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2011, **26**(5):1099-1110.
- 114. Bouquier N, Vignal E, Charrasse S, Weill M, Schmidt S, Leonetti JP, Blangy A, Fort P: **A cell** active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chemistry & biology* 2009, **16**(6):657-666.
- 115. Blangy A, Bouquier N, Gauthier-Rouviere C, Schmidt S, Debant A, Leonetti JP, Fort P: Identification of TRIO-GEFD1 chemical inhibitors using the yeast exchange assay. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2006, **98**(9):511-522.
- 116. Shutes A, Onesto C, Picard V, Leblond B, Schweighoffer F, Der CJ: **Specificity and** mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *The Journal of biological chemistry* 2007, 282(49):35666-35678.
- 117. Bosco EE, Kumar S, Marchioni F, Biesiada J, Kordos M, Szczur K, Meller J, Seibel W, Mizrahi A, Pick E *et al*: Rational design of small molecule inhibitors targeting the Rac GTPase-p67(phox) signaling axis in inflammation. *Chemistry & biology* 2012, 19(2):228-242.
- 118. Murray BW, Guo C, Piraino J, Westwick JK, Zhang C, Lamerdin J, Dagostino E, Knighton D, Loi CM, Zager M *et al*: **Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(20):9446-9451.
- 119. Irwin JJ, Shoichet BK: **ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening**. *Journal of chemical information and modeling* 2005, **45**(1):177-182.
- 120. 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):1757-1768.
- 250ldos Z, Reid D, Simon A, Sadjad SB, Johnson AP: **eHiTS: a new fast, exhaustive flexible ligand docking system**. *Journal of molecular graphics & modelling* 2007, **26**(1):198-212.
- 122. 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):288-297.
- 123. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG: Frequent coalterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999, **9**(3):469-479.
- 124. Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, Collard JG: 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):537-549.

- 125. Du J, Xu R, Hu Z, Tian Y, Zhu Y, Gu L, Zhou L: **PI3K and ERK-induced Rac1 activation** mediates hypoxia-induced HIF-1alpha expression in MCF-7 breast cancer cells. *PloS one* 2011, **6**(9):e25213.
- 126. Pille JY, Denoyelle C, Varet J, Bertrand JR, Soria J, Opolon P, Lu H, Pritchard LL, Vannier JP, Malvy C *et al*: **Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo**. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2005, **11**(2):267-274.
- 127. Wang H, Kazanietz MG: Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(6):4541-4550.
- 128. Stam JC, Sander EE, Michiels F, van Leeuwen FN, Kain HE, van der Kammen RA, Collard JG: Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. The Journal of biological chemistry 1997, 272(45):28447-28454.
- 129. Michiels F, Stam JC, Hordijk PL, van der Kammen RA, Ruuls-Van Stalle L, Feltkamp CA, Collard JG: Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *The Journal of cell biology* 1997, 137(2):387-398.
- 130. Lu Q, Longo FM, Zhou H, Massa SM, Chen YH: **Signaling through Rho GTPase pathway as viable drug target**. *Current medicinal chemistry* 2009, **16**(11):1355-1365.
- 131. Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B: **Rho GTPases in human breast** tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *British journal of cancer* 2002, **87**(6):635-644.
- 132. Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, Yoshida K: **Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, **10**(14):4799-4805.
- 133. Buongiorno P, Bapat B: **Rho GTPases and cancer**. *Progress in molecular and subcellular biology* 2005, **40**:29-53.
- 134. Katz E, Sims AH, Sproul D, Caldwell H, Dixon MJ, Meehan RR, Harrison DJ: **Targeting of Rac GTPases blocks the spread of intact human breast cancer**. *Oncotarget* 2012, **3**(6):608-619.
- 135. Fanger GR, Johnson NL, Johnson GL: **MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42**. *The EMBO journal* 1997, **16**(16):4961-4972.
- 136. Itoh RE, Kiyokawa E, Aoki K, Nishioka T, Akiyama T, Matsuda M: **Phosphorylation and activation of the Rac1 and Cdc42 GEF Asef in A431 cells stimulated by EGF**. *Journal of cell science* 2008, **121**(Pt 16):2635-2642.
- 137. Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y: **Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades**. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009, **66**(3):370-374.
- 138. Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 1998, 279(5350):509-514.
- 139. Ridley AJ: **Rho GTPases and cell migration**. *Journal of cell science* 2001, **114**(Pt 15):2713-2722.
- 140. Fritz G, Kaina B: **Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs**. *Current cancer drug targets* 2006, **6**(1):1-14.
- 141. Fortin Ensign SP, Mathews IT, Symons MH, Berens ME, Tran NL: Implications of Rho GTPase Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression. Frontiers in oncology 2013, 3:241.
- 142. Ye DZ, Field J: **PAK signaling in cancer**. *Cellular logistics* 2012, **2**(2):105-116.

- 143. Aoki H, Yokoyama T, Fujiwara K, Tari AM, Sawaya R, Suki D, Hess KR, Aldape KD, Kondo S, Kumar R *et al*: **Phosphorylated Pak1 level in the cytoplasm correlates with shorter survival time in patients with glioblastoma**. *Clinical cancer research*: *an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007, **13**(22 Pt 1):6603-6609.
- 144. Pervaiz S, Cao J, Chao OS, Chin YY, Clement MV: **Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells**. *Oncogene* 2001, **20**(43):6263-6268.
- 145. Yoshida T, Zhang Y, Rivera Rosado LA, Chen J, Khan T, Moon SY, Zhang B: **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):1657-1668.
- 24(14):6205-6214. Zhang B, Zhang Y, Shacter E: Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75. *Molecular and cellular biology* 2004, **24**(14):6205-6214.
- 147. Senger DL, Tudan C, Guiot MC, Mazzoni IE, Molenkamp G, LeBlanc R, Antel J, Olivier A, Snipes GJ, Kaplan DR: **Suppression of Rac activity induces apoptosis of human glioma cells but not normal human astrocytes**. *Cancer research* 2002, **62**(7):2131-2140.
- 148. Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, Michaelson D, Knaus UG, Philips MR, Symons M: Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* 2005, **24**(53):7821-7829.
- 149. Giese A: Glioma invasion--pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumorsuppressor p53 and proto-oncogene ETS-1. Acta neurochirurgica Supplement 2003, 88:153-162.
- 150. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR: **Cell migration: integrating signals from front to back**. *Science* 2003, **302**(5651):1704-1709
- 151. Ma J, Xue Y, Liu W, Yue C, Bi F, Xu J, Zhang J, Li Y, Zhong C, Chen Y: Role of activated rac1/cdc42 in mediating endothelial cell proliferation and tumor angiogenesis in breast cancer. *PloS one* 2013, **8**(6):e66275.
- Jordan P, Brazao R, Boavida MG, Gespach C, Chastre E: **Cloning of a novel human Rac1b** splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* 1999, **18**(48):6835-6839.
- 153. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, Leake D, Godden EL, Albertson DG, Nieto MA *et al*: **Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability**. *Nature* 2005, **436**(7047):123-127.
- 154. Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, Der CJ: **Rac1b**, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene* 2004, **23**(58):9369-9380.
- 155. Yang C, Liu Y, Leskow FC, Weaver VM, Kazanietz MG: Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by {beta}2-chimerin. The Journal of biological chemistry 2005, 280(26):24363-24370.
- 156. Han G, Fan B, Zhang Y, Zhou X, Wang Y, Dong H, Wei Y, Sun S, Hu M, Zhang J *et al*: **Positive regulation of migration and invasion by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway in human breast cancer cells**. *Oncology reports* 2008, **20**(4):929-939.
- 157. Baugher PJ, Krishnamoorthy L, Price JE, Dharmawardhane SF: Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast cancer research*: *BCR* 2005, **7**(6):R965-974.

- 158. Montero JC, Seoane S, Ocana A, Pandiella A: **P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer**. *Oncogene* 2011, **30**(9):1059-1071.
- 159. Cai D, lyer A, Felekkis KN, Near RI, Luo Z, Chernoff J, Albanese C, Pestell RG, Lerner A: **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):6802-6808.
- 160. Felekkis KN, Narsimhan RP, Near R, Castro AF, Zheng Y, Quilliam LA, Lerner A: **AND-34** activates phosphatidylinositol 3-kinase and induces anti-estrogen resistance in a SH2 and GDP exchange factor-like domain-dependent manner. *Molecular cancer research : MCR* 2005, **3**(1):32-41.
- 161. Rosenblatt AE, Garcia MI, Lyons L, Xie Y, Maiorino C, Desire L, Slingerland J, Burnstein KL: 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):207-219.
- 162. Dokmanovic M, Hirsch DS, Shen Y, Wu WJ: Rac1 contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells: Rac1 as a potential therapeutic target for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer. *Molecular cancer therapeutics* 2009, **8**(6):1557-1569.
- 163. Zhao Y, Wang Z, Jiang Y, Yang C: Inactivation of Rac1 reduces Trastuzumab resistance in PTEN deficient and insulin-like growth factor I receptor overexpressing human breast cancer SKBR3 cells. *Cancer letters* 2011, **313**(1):54-63.
- 164. Varol U, Karaca B, Patir P, Sener A, Zekioglu O, Sanli U, Uslu R: **Association of Rac1 Expression with Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer**. *International Journal of Hematology and Oncology* 2013, **23**(4):219-226.
- 165. Yan Y, Greer PM, Cao PT, Kolb RH, Cowan KH: **RAC1 GTPase plays an important role in gamma-irradiation induced G2/M checkpoint activation**. *Breast cancer research : BCR* 2012, **14**(2):R60.
- Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S: **MAPK pathways in radiation responses**. *Oncogene* 2003, **22**(37):5885-5896.
- 167. Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, Fortin SP, Winkles JA, Symons M, Nakada M, Cunliffe HE, Hostetter G, Hoelzinger DB *et al*: Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. *Cancer research* 2006, 66(19):9535-9542.
- 168. Nakada M, Drake KL, Nakada S, Niska JA, Berens ME: **Ephrin-B3 ligand promotes glioma** invasion through activation of Rac1. *Cancer research* 2006, **66**(17):8492-8500.
- 169. Salhia B, Rutten F, Nakada M, Beaudry C, Berens M, Kwan A, Rutka JT: **Inhibition of Rhokinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1**. *Cancer research* 2005, **65**(19):8792-8800.
- 170. Feng H, Hu B, Liu KW, Li Y, Lu X, Cheng T, Yiin JJ, Lu S, Keezer S, Fenton T *et al*: **Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFRalpha-stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans**. *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**(12):4670-4684.
- 171. Feng H, Hu B, Jarzynka MJ, Li Y, Keezer S, Johns TG, Tang CK, Hamilton RL, Vuori K, Nishikawa R *et al*: **Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastoma tumorigenesis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(8):3018-3023.

- 172. Feng H, Hu B, Vuori K, Sarkaria JN, Furnari FB, Cavenee WK, Cheng SY: **EGFRVIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180**. *Oncogene* 2014, **33**(19):2504-2512.
- 173. Huse JT, Holland EC: **Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma**. *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(5):319-331.
- 174. Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ: **p21-activated kinases in cancer**. *Nature reviews Cancer* 2006, **6**(6):459-471.
- 175. Ong CC, Jubb AM, Haverty PM, Zhou W, Tran V, Truong T, Turley H, O'Brien T, Vucic D, Harris AL *et al*: **Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(17):7177-7182.
- 176. Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Kim MS, Lee SH, Park IC, Rhee CH, Hong SI: Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer research* 2006, 66(17):8511-8519.
- 177. Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, Dichgans J, Wick W: **Sublethal irradiation promotes** migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer research* 2001, **61**(6):2744-2750.
- 178. Hirata E, Yukinaga H, Kamioka Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Okada T, Sahai E, Matsuda M: In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *Journal of cell science* 2012, **125**(Pt 4):858-868.
- 179. Hu B, Symons M, Salhia B, Fortin SP, Tran NL, Rutka J, Cheng SY: **Rho GTPases and Their Activators, Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs): Their Roles in Glioma Cell Invasion**. In: *Signaling Pathways and Molecular Mediators in Metastasis*. Edited by Fatatis A: Springer Netherlands; 2012: pp 143-169.
- 180. Camphausen K, Purow B, Sproull M, Scott T, Ozawa T, Deen DF, Tofilon PJ: Influence of in vivo growth on human glioma cell line gene expression: convergent profiles under orthotopic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(23):8287-8292.
- 181. Pardridge WM: **The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development**. *NeuroRx :* the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 2005, **2**(1):3-14.