



**Universidad de Valladolid
Facultad de Medicina
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología**

Análisis del papel de β 2-quimerina en cáncer de mama

TESIS DOCTORAL

Presentada por **Victoria Casado Medrano** para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Directora: **Dra. María José Caloca Roldán**

La Dra. María José Caloca Roldán, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología y Genética Molecular de Valladolid

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Análisis del papel de β 2-quimerina en cáncer de mama**” presentado por Dña. **Victoria Casado Medrano**, licenciada en Biotecnología por la Universidad de León, ha sido realizado bajo mi dirección en el Instituto de Biología y Genética Molecular de Valladolid y reúne a mi juicio originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y pueda optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valladolid, a 30 de julio de 2014.

Fdo. María José Caloca Roldán

Este proyecto de tesis ha sido financiado por:

- El Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-08051)
- La Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad (BIO103/VA44/11)
- Una beca EMBO (Short Term Fellowship) para estancias internacionales.

A Arturo

'El éxito es la habilidad de ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo'
Winston Churchill

INDÍCE GENERAL

Índice General.....	1
Abreviaturas.....	5
Resumen (Summary).....	9
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Cáncer de mama.....	15
1.1 Epidemiología y factores de riesgo.....	15
1.2 Morfología y desarrollo de la glándula mamaria.....	16
1.2.1 Anatomía comparada de la mama normal.....	17
1.2.2 Desarrollo de la glándula mamaria.....	18
1.3 Tipos de lesiones neoplásicas y clasificación del cáncer de mama.....	18
1.3.1 Clasificación histopatológica del cáncer de mama.....	18
1.3.2 Clasificación del cáncer de mama según el perfil de expresión génica.....	19
1.4 Cáncer de mama HER2/ErbB2 positivo.....	21
1.4.1 Modelos animales de cáncer de mama HER2 positivo: ratones MMTV-Neu.....	22
2. Rho GTPasas.....	23
2.1 Regulación de las Rho GTPasas.....	24
2.2 Funciones de las Rho GTPasas.....	26
2.2.1 Regulación del citoesqueleto.....	26
2.2.2 Regulación de la expresión génica, ciclo celular y supervivencia.....	29
2.3 Rho GTPasas y cáncer de mama.....	30
3. Las GTPasas Rac.....	31
3.1 Regulación de Rac.....	32
3.2 Funciones celulares de Rac.....	33
3.2.1 Función de Rac en la reorganización del citoesqueleto de actina.....	34
3.2.1.1 Formación de lamelipodios.....	34
3.2.2 Función de Rac en la adhesión celular.....	36
3.2.3 Función de Rac en la progresión del ciclo celular.....	37
3.2.4 Función de Rac en la supervivencia celular.....	37
3.2.5 Otras funciones de Rac.....	38
3.2.5.1 Regulación de actividades enzimáticas.....	38
3.2.5.2 Regulación del transporte de glucosa.....	38
3.3 Papel de Rac en el desarrollo y progreso tumoral.....	39
3.3.1 Papel de Rac en la transformación maligna.....	39
3.3.2 Papel de Rac en invasión y metástasis.....	39
3.3.3 Papel de Rac en la angiogénesis.....	40
3.4 Alteraciones de la actividad de Rac en cáncer de mama.....	41
3.4.1 Alteraciones de Rac.....	41
3.4.2 Alteraciones de RacGEFs y RacGAPs.....	42

Índice

4.	Quimerinas.....	43
4.1	Genes de las quimerinas	43
4.2	Estructura y propiedades bioquímicas.....	44
4.2.1	Dominio C1.....	44
4.2.2	Dominio GAP	45
4.2.3	Dominio SH2	46
4.3	Estructura tridimensional y modelo de regulación	46
4.4	Rutas de señalización reguladas por las quimerinas.....	48
4.4.1	Quimerinas como efectores de receptores tirosina quinasa y GPCR.....	48
4.4.2	Interacción con otras proteínas	48
4.5	Funciones biológicas de los miembros de la familia de las quimerinas	49
4.5.1	Funciones de las quimerinas en el sistema nervioso	49
4.5.2	Funciones de las quimerinas en el sistema inmune.....	50
4.5.3	Funciones de las quimerinas en el desarrollo	50
4.6	Enfermedades asociadas con las alteraciones de las quimerinas	50
4.6.1	β 2-quimerina y cáncer de mama	51
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1.	Modelos murinos	59
1.1	Ratones Knockout para β 2-quimerina (ratones <i>chn2</i> ^{-/-})	59
1.2	Ratones ErbB2/Neu.....	59
1.3	Generación de ratones MMTV-ErbB2/Neu deficientes en β 2-quimerina.....	59
2.	Genotipado de los animales utilizados en el estudio.....	60
2.1	Extracción de ADN genómico.....	60
2.2	Identificación de animales transgénicos <i>MMTV-ErbB2/Neu</i>	60
2.3	Identificación de animales deficientes en β 2-quimerina	61
3.	Evaluación de la aparición y desarrollo de tumores de mama en los modelos murinos.....	63
4.	Sacrificio de los animales y recogida de muestras.....	63
5.	Estudios histológicos.....	64
5.1	Inclusión de los tejidos en parafina	64
5.2	Tinción con hematoxilina-eosina	65
5.3	Evaluación histopatológica	66
5.4	Cuantificación de focos metastásicos en pulmón.....	66
5.5	Inmunohistoquímica	67
5.6	Detección y cuantificación de lesiones preneoplásicas mediante tinción con alumbre carmín.....	67
6.	Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	68
7.	Generación de líneas celulares estables	69
7.1	Plásmidos	69
7.2	Transfecciones	70
7.3	Selección de las poblaciones control y β 2-quimerina	70
7.4	Purificación de subpoblaciones mediante citometría de flujo.....	71
8.	Análisis de expresión proteica	71

8.1 Extracción de proteínas	71
8.2 Cuantificación de proteína.....	71
8.3 Geles de poliacrilamida, Western blot e inmunodetección.....	72
9. Purificación de la proteína de fusión GST-PBD	73
10. Ensayo de activación de Rac o <i>Pull Down</i>	74
11. Inmunofluorescencia	75
12. Análisis de la adhesión a colágeno tipo IV	75
13. Ensayo de adhesión intercelular mediante cultivo en gotas colgantes (<i>hanging drops</i>)	76
14. Análisis de migración mediante ensayo de “cierre de herida” o “wound healing”	76
15. Análisis de la invasión	77
16. Experimento de formación ‘ <i>de novo</i> ’ de contactos intercelulares mediados por calcio.	77
17. Análisis estadístico.....	77
RESULTADOS	79
1. Generación de un modelo murino de cáncer de mama deficiente en $\beta 2$ -quimerina....	81
2. Análisis de los tumores de mama en ratones MMTV-ErbB2/Neu deficientes en $\beta 2$ -quimerina.....	82
2.1 Análisis de la incidencia y tiempo de latencia.....	82
2.2 Número de tumores de mama	83
2.3 Volumen tumoral y velocidad de crecimiento	84
2.4 Evaluación de la presencia de lesiones preneoplásicas	86
2.5 Análisis histopatológico de tumores de mama.....	87
2.6 Análisis de la proliferación de las células tumorales	89
2.7 Análisis de la apoptosis tumoral	90
2.8 Evaluación de la angiogénesis tumoral.....	92
3. Relación entre la expresión de $\beta 2$ -quimerina y metástasis pulmonar	93
4. Análisis del papel de $\beta 2$ -quimerina en las rutas de señalización implicadas en el cáncer de mama	95
4.1 Activación de Rac.....	95
4.2 Evaluación de la activación de AKT y ERK	96
4.3 Evaluación de la expresión de ciclina D1	97
4.4 Análisis de la expresión de E-cadherina y β -catenina	98
5. Análisis del papel de $\beta 2$ -quimerina en las rutas de señalización mediadas por ErbB2/Neu en la fase temprana de la enfermedad	100
6. Estudio del papel de $\beta 2$ -quimerina en otros modelos de cáncer de mama	103
6.1 Generación de líneas estables MCF7 y LM2 con expresión de $\beta 2$ -quimerina	104
6.2 Efecto de $\beta 2$ -quimerina en la activación de Rac.....	104
6.3 Evaluación de la activación de las rutas PI3K/AKY, ERK y expresión de ciclina D1	105
6.4 Efecto de $\beta 2$ -quimerina en los procesos mediados por el citoesqueleto.....	107
6.4.1 Efecto de $\beta 2$ -quimerina en el citoesqueleto de actina	107
6.4.2 Efecto de $\beta 2$ -quimerina en la adhesión celular	109
6.4.3 Efecto de $\beta 2$ -quimerina en la migración celular	111
6.4.4 Invasión celular	113
6.5 Estudio del papel de $\beta 2$ -quimerina en las uniones célula-célula	114

Índice

6.5.1 Efecto en la expresión y localización de E-cadherina.....	114
6.5.2 Estudio de agregación celular mediante <i>hanging drops</i>	116
6.5.3 Papel de β 2-quimerina en la formación de contactos intercelulares <i>de novo</i> a través E-cadherina mediados por calcio.....	118
DISCUSIÓN	121
1. Función de β 2-quimerina en cáncer de mama tipo HER2 positivo en el modelo de ratón MMTV/Neu	123
1.1 β 2-quimerina tienen un papel esencial en las fases iniciales del proceso tumoral, pero favorece un fenotipo tumoral menos agresivo durante la evolución del cáncer de mama	123
1.2 La deficiencia de β 2-quimerina reduce la susceptibilidad al desarrollo de metástasis pulmonar en el modelo de ratón MMTV/Neu	127
2. La expresión de β 2-quimerina en líneas celulares de cáncer de mama reduce la activación de Rac, modifica la reorganización del citoesqueleto de actina y retrasa la transición epitelio-mesénquima	129
CONCLUSIONES	135
REFERENCIAS.....	139

A B R E V I A T U R A S

AJ	Uniones adherentes	<i><u>A</u>dh<u>e</u>rens <u>J</u>unction</i>
APC	Células presentadoras de antígeno	<i><u>A</u>ntigen <u>P</u>resenting <u>C</u>ells</i>
BH	Homólogo a bcr	<i><u>b</u>cr <u>H</u>omology</i>
BSA	Albúmina bovina sérica	<i><u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumin</i>
Cdks	Quinasas dependientes de ciclina	<i><u>c</u>yclin <u>d</u>e<u>p</u>endent <u>k</u>inase</i>
DAG	Diacilglicerol	<i><u>D</u>iacyl<u>g</u>lycerol</i>
DGK	Quinasas de DAG	<i><u>D</u>AG <u>K</u>inases</i>
DH	Homólogo al linfoma difuso de células B	<i><u>D</u>ifuse <u>B</u> Cell <u>L</u>ymphoma <u>H</u>omology</i>
DHR2	Homólogos a la región 2 de Dock	<i><u>D</u>ock <u>H</u>omology <u>R</u>egion <u>2</u></i>
DRF	Proteína homóloga a formina	<i><u>D</u>iaphanous-<u>r</u>elated <u>f</u>ormin</i>
ECM	Matriz extracelular	<i><u>E</u>xtracellular <u>M</u>atrix</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	<i><u>E</u>pidermal <u>G</u>rowth <u>F</u>actor</i>
EMT	Transición epitelio-mesénquima	<i><u>E</u>pithelial <u>M</u>esenchymal <u>T</u>ransition</i>
ER	Receptor de estrógenos	<i><u>E</u>strogen <u>r</u>eceptor</i>
ERK1/2	Quinasas reguladas por señales extracelulares	<i><u>E</u>xtracellular signal <u>r</u>egulated <u>K</u>inase</i>
FA	Adhesión focal	<i><u>F</u>ocal <u>a</u>dhesion</i>
FAK	Quinasa de adhesión focal	<i><u>F</u>ocal <u>a</u>dhesion <u>k</u>inase</i>
FBS	Suero bovino fetal	<i><u>F</u>etal <u>b</u>ovine <u>s</u>erum</i>
GAP	Proteínas activadoras de GTPasa	<i><u>G</u>TPases <u>a</u>ctivating <u>p</u>rotein</i>
GBD	Dominio de unión a GTP	<i><u>G</u>TP <u>b</u>inding <u>d</u>omain</i>
GDI	Inhibidores de disociación de guanina	<i><u>G</u>uanine <u>d</u>issociation <u>i</u>nhibitors</i>
GDP	Guanosina-difosfato	<i><u>G</u>uanosine <u>d</u>iphosphate</i>

Abreviaturas

GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina	<i>Guanine nucleotide Exchange factors</i>
GFP	Proteína fluorescente verde	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G	<i>G Protein Coupled Receptors</i>
GTP	Guanosín trifosfato	<i>Guanosine triphosphate</i>
H&E	Hemotoxilina y Eosina	<i>Hematoxylin and Eosin</i>
HRG	Heregulina	<i>Heregulin</i>
IKK	Inhibidor de la quinasa $\kappa\beta$	<i>Inhibitor of factor κ-β Kinase</i>
IPTG	Isopropil- β -tiogalactopiranosido	<i>Isopropyl-β-thiogalactopyranoside</i>
JNK	Quinasa N-terminal de Jun	<i>Jun N-terminal kinases</i>
KO		<i>KnockOut</i>
LIMK	Quinasa de LIM	<i>LIM kinase</i>
LPA	Ácido lisofosfatídico	<i>Lysophosphatidic acid</i>
LTR	Repetición terminal larga	<i>Long Terminal Repeat</i>
MET	Transición mesénquima-epitelio	<i>Mesenchymal-epithelial transition</i>
MLC	Cadena ligera de miosina	<i>Myosin light chain</i>
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
MMTV	Virus de tumor de mama de ratón	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
NMDAr	Receptor de N-metil-D-aspartato	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
NOS	Óxido nítrico sintasa	<i>Nitric oxide synthase</i>
OFP	Proteína fluorescente naranja	<i>Orange fluorescent protein</i>
PA	Ácido fosfatídico	<i>Phosphatidic acid</i>
Pak	Quinasa asociada a p21	<i>p21-activated kinase</i>
PBD	Dominio de unión a p21	<i>p21 Binding Domain</i>

PBS	Tampón fosfato salino	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	<i>Platelet derived growth factor</i>
PH	Homólogo a pleckstrina	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa	<i>Phosphatidyl inositol-3-kinase</i>
PKC	Proteína quinasa C	<i>Protein kinase C</i>
PKD	Proteína quinasa D	<i>Protein kinase D</i>
PLC	Fosfolipasa C	<i>Phospholipase C</i>
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PR	Receptor de progesterona	<i>Progesterone receptor</i>
PS	Fosfatidilserina	<i>Phosphatidylserine</i>
PtdIns	Fosfatidilinositol	<i>Phosphatidyl inositol</i>
qPCR	PCR cuantitativa	<i>quantitative PCR</i>
RACK1	Receptor de la quinasa activada C1	<i>Receptor of activated C kinase1</i>
RasGRP	Proteína liberadora de guanina de Ras	<i>Ras guanine releasing protein</i>
Rb	Retinoblastoma	<i>Retinoblastoma</i>
Rho	Homólogo de Ras	<i>Ras homology</i>
ROCK	Quinasa de Rho	<i>Rho-associated kinase</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno	<i>Reactive oxygen species</i>
SCAR/	Proteínas supresoras del receptor de cAMP/	<i>Suppressor of cAMP receptor/</i>
SFK	Quinasa de la familia de Src	<i>Src family kinase</i>
SRF	Factor de respuesta a suero	<i>Serum Response Factor</i>
TCR	Receptores de células T	<i>T cell receptor</i>

Abreviaturas

TEBs	Yemas terminales	<i><u>T</u>erminal <u>E</u>nd <u>B</u>uds</i>
TGF	Factor de crecimiento transformante β	<i><u>T</u>ransforming <u>g</u>rowth <u>f</u>actor β</i>
TJ	Uniones estrechas	<i><u>T</u>ight <u>J</u>unction</i>
WASP	Proteínas del síndrome de Wiskott- Aldrich	<i><u>W</u>iskott-<u>A</u>ldrich <u>S</u>yndrome <u>P</u>rotein</i>
WAVE	Proteínas WASP homólogas a verprolina	<i><u>W</u>ASP <u>V</u>erprolin-homologous</i>
WT	Silvestre	<i><u>W</u>ild <u>t</u>ype</i>

S U M M A R Y

The Rho/Rac GTPases are a family of small G-proteins, which play an important role in cytoskeleton rearrangements. These proteins regulate numerous cellular processes including cellular adhesion, migration, proliferation, survival, differentiation and malignant transformation. Therefore, the precise control of the spatial and temporal activation of Rho GTPases has critical importance to cells¹.

The Rho/Rac GTPases function as molecular switches that cycle between an inactive, GDP-bound form and an active, GTP-bound form. The fluctuation between the active and inactive state of GTPases is highly regulated by three types of proteins: GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) which activate the GTPases by increasing the release rate of bound nucleotides, GAPs (GTPase Activating Proteins) that stimulate the endogenous activity of GTPase and lead G-protein inactivation, and the third class GDIs (GDP Dissociation Inhibitors) which prevent the replacement of GDP by GTP².

The most studied members of this family in humans are: Rho (RhoA, RhoB and RhoC), Rac (Rac1, Rac2, Rac3 and Rac1b) and Cdc42 (Cdc42)³. These subfamilies are well known for their role in each of the multiple steps in tumorigenesis: upregulation of proliferation, cytoskeletal organization, de-differentiation, invasion, migration and metastasis. Hyperactivation of these GTPases are frequently found in tumors. However, there is no evidence for activating mutations of Rho GTPases in human tumors and the increased GTP loading (activation) is mainly mediated by alterations in their regulatory proteins⁴. As an example, many Rho-GEFs have been identified as oncogenes such as Vav and Tiam1. As proteins with opposite function to GEFs, GAPs might be expected to function as tumor suppressors. This function has been demonstrated for DLC, GRAF, P190 and IQGAP⁵, and emerging evidences suggest also this role for β 2-chimaerin, GAP protein object of our study.

β 2-chimaerin is one of the members of the chimaerin family of GAP proteins. Structurally, β 2-chimaerin is composed of an N-terminal SH2 domain involved in heteromolecular interactions, a C1 domain that binds diacylglycerol (DAG) and a catalytic GAP domain with specificity for the Rac GTPase^{6, 7}. Several studies show the downregulation of β 2-chimaerin in malignant gliomas, in breast cancer cells and duodenal adenocarcinomas, suggesting a role for β 2-chimaerin as a tumour suppressor in these types of cancer. Inactivation of β 2-chimaerin would results in increased Rac activity and supporting this hypothesis, hyperactive Rac1 has been associated with increased, proliferation, and invasion of breast cancer⁸.

Summary

Rac1 regulates the rearrangement of the actin cytoskeleton required for the formation of lamellipodia that are specific for forward migration during invasion. The control of cytoskeleton reorganization via Rac involves at least two different mechanisms. One involves the activation of Arp2/3, which has a prominent role in actin polymerization through WAVE/Scar indirect activation. A second mechanism is mediated by Pak (p21-activated kinase). PAK activated by Rac/Cdc42 induces formation of lamellipodia, filopodia, the membrane ruffles, stress fibers and remodeling of focal adhesion complexes. Proteins involved in the cytoskeletal reorganization include the main components of the actomyosin cytoskeleton, intermediate filaments, microtubules, integrins, and a variety of proteins associated with the above⁹. Rac1 also has essential roles in the regulation of cytoskeletal dynamics controlling cell-cell and cell-matrix adhesion. The deregulation of these processes favors migration and invasiveness and is a hallmark of tumor progression⁵.

All the data summarized here suggest that β 2-chimaerin may play an important role in the control of actin cytoskeleton through the modulation of Rac activity and that inactivation of β 2-chimaerin in tumors may contribute to the invasive properties of cancer cells due to Rac hyperactivation.

In the present study we analyze the role of β 2-chimaerin as a tumor suppressor in breast cancer with two different experimental approaches. One is the analysis of breast tumor development in β 2-chimaerin knock-out mice. A second approach is the overexpression of β 2-chimaerin in human breast cancer cell lines.

The mouse model was generated by crossing the β 2-chimaerin knock-out mice (KO) with the MMTV-Neu mice (*chn2^{-/-}/Neu*), a well known genetic model for breast carcinogenesis. The MMTV-Neu mice have an amplification of the gene encoding ErbB2, whose hyperactivation is associated with a high number of breast tumors. To study the effect of β 2-chimaerin downregulation in the development of breast tumors several experiments were performed including monitoring breast tumor (incidence, latency and tumor multiplicity) and mammary gland (preneoplastic lesions).

Our results from the analysis of the mouse model showed a similar incidence for breast tumor development independent on genotypes but a strong reduction in breast tumor latency in absence of β 2-chimaerin. This result suggests that KO mice are more susceptible to tumor development. Despite the fact that there were no differences in the breast tumor multiplicity, we observed an increased presence of preneoplastic lesions in the mammary glands. These findings suggest that β 2-chimaerin is playing an important role in the initial stage of breast cancer development. Moreover, the metastatic phenotype of *chn2^{-/-}/Neu* mice showed reduced incidence in

the development of lung metastasis than control mice, however the multiplicity of metastatic foci was higher in absence of $\beta 2$ -chimaerin.

Mice breast tumors were subjected to histological evaluation and immunohistological analysis with common markers for proliferation (Ki67, and cyclin D1), apoptosis (cleaved caspasa-3) and cell-cell junctions (E-cadherin). This examination was completed with biochemical studies to assess Rac activity as AKT and ERK activation. The overall results showed a tumor phenotype with minor differences between both genotypes in processes such as angiogenesis or dedifferentiation. However, $\beta 2$ -chimaerin deficient mice had a markedly reduced tumor growth due to a decreased proliferation and increased cell death by apoptosis. Although tumors arising from $\beta 2$ -chimaerin KO mice had higher levels of active Rac, they showed no differences in cyclin D1 expression, or phosphorylation of either AKT or ERK.

In order to further study the role of $\beta 2$ -chimaerin in metastasis, we analyzed the effect of the expression of this protein in human breast cancer cell lines. With that aim, we generated cells stably expressing $\beta 2$ -chimaerin in MCF7 (MCF7- $\beta 2$) and LM2 (LM2- $\beta 2$), two cells lines with $\beta 2$ -chimaerin downregulation, different cellular phenotype and metastatic potential. We first confirmed that re-expression of $\beta 2$ -chimaerin in these cells resulted in a decrease in the levels of active Rac. Next, we studied the impact of $\beta 2$ -chimaerin expression in the control of actin cytoskeleton and the dynamic processes that are involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Loss of cell-cell adherence is one of the most important changes that must take place during EMT, and allow tumor cells to migrate into blood vessels or lymphatic tissue, and to invade distant organs.

We performed multi-parameter time-lapse imaging of the cells by analyzing wound healing, adhesion dynamics in an extracellular matrix (collagen IV) and invasion assays with Matrigel and Boyden chambers. Data obtained from these experiments revealed that cell migration and invasion are impaired in presence of $\beta 2$ -chimaerin, paralleled with altered actin cytoskeleton structures (lamellipodia, stress fibres and protrusion formations). In cells of mesenchymal phenotype (LM2), expression of $\beta 2$ -chimaerin increased either the area or the velocity of cell adherence to substratum, especially in presence of collagen IV, which suggests a role for $\beta 2$ -chimaerin on cell spreading. On the other hand, focal adhesions showed equal size and were distributed homogeneously at peripheral attachment points. These adhesions appeared equidistant from the nucleus, which indicates lack of polarisation independently of $\beta 2$ -chimaerin expression. Finally, LM2- $\beta 2$ cells had reduced capacity to migrate in a wound healing assay or through matrigel compared with control cells. In epithelial cells (MCF7), expression of $\beta 2$ -chimaerin resulted in a marked reduction of E-cadherin staining at the cell contacts, as analyzed by confocal microscopy, which paralleled with reduced E-cadherin protein levels observed by

Summary

western blot analysis. In addition, we demonstrated that β 2-chimaerin reduce the strength of intercellular contacts with a hanging drop assay. Finally, we carried out a calcium switch assay to investigate whether β 2-chimaerin was involved in the initial formation, or in the stabilization of cell junctions. We observed that control cells restored the junctions almost completely after 15 minutes following the calcium switch, as revealed by E-cadherin and actin staining. Nevertheless, only a small fraction of the junctions between β 2-chimaerin expressing cells demonstrated proper E-cadherin localization 45 minutes after the calcium switch.

Taken together, these results suggest a dual role of β 2-chimaerin in breast cancer. While downregulation of this protein in animal models accelerates breast tumor onset, it reduces tumor malignancy and susceptibility to develop metastasis. We also describe a different role for β 2-chimaerin depending on the cell type. In transformed breast mesenchymal cells, β 2-chimaerin may have a protective role in metastasis by decreasing cell migration and invasion, whereas expression of β 2-chimaerin in epithelial breast cancer cells results in reduced cell-cell adhesion.

INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de este estudio es determinar el papel que desempeña la proteína β 2-quimerina en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Con esta finalidad, se han utilizado dos líneas celulares y un modelo animal representativos de tres subtipos principales de tumores de mama, HER2 positivo, luminal A y triple negativo.

En el primer apartado de la introducción se explicarán aspectos generales de la enfermedad del cáncer de mama. En el segundo apartado se describirán las características generales de la familia de las Rho GTPasas a la que pertenece la proteína Rac, sobre la que se profundizará en el tercer apartado. Finalmente se describirá la estructura, regulación y funciones biológicas de la familia de las quimerinas, especialmente de la isoforma β 2-quimerina por ser la proteína objeto de nuestro estudio. A lo largo de los diferentes apartados se detallarán las evidencias biológicas que relacionan a esta proteína con la patología del cáncer de mama.

1. Cáncer de mama

1.1 Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer de mama es una enfermedad genética ya que, como el resto de los cánceres, se produce por una acumulación de alteraciones en el material genético. A pesar de que se sabe que unos pocos genes son los responsables de la mayoría de los casos de cáncer de mama, existen una gran cantidad de genes denominados de predisposición, los cuales contribuyen al desarrollo de los casos clasificados como esporádicos¹⁰. Además, el cáncer de mama también cuenta con un componente hereditario pudiéndose distinguir en el cáncer de mama entre el esporádico y con agregación familiar.

Dentro del cáncer de mama con agregación familiar, el hereditario constituye la mitad de los casos, en los cuales se ha identificado un patrón de genes con herencia autosómica dominante. Algunos de los genes que se han relacionado con el desarrollo del cáncer de mama hereditario son los genes *BRCA1* y *2* (*Breast Cancer Susceptibility Genes-1* y *2*), cuyas mutaciones se asocian con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama y ovario^{11, 12}. Mutaciones en estos dos genes constituyen el 2-3% de todos los cánceres de mama y alrededor del 30-40% del cáncer de mama con agregación familiar¹³. Existen además otros genes que se encuentran mutados en cáncer de mama hereditario, como *CHEK2* (*Cell Cycle Checkpoint Kinase gene*), *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*), *NBS1* (*NijmegenBreakage Syndrome protein-1 homolog*), *RAD50* (*Repair Protein DNA RAD50*), *BRIP1* (*BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1*), *PALB2* (*Partner and localizer of BRCA2*), *TP53* (*Tumor suppressor p53*) y *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*). En el cáncer hereditario hay además un componente de genes modificadores o poligenes, que modifican el efecto del gen principal^{14, 15}.

El cáncer de mama esporádico representa la gran mayoría de los cánceres de mama (entre el 80% y el 85% del total) y surge como resultado de una acumulación adquirida de alteraciones genéticas somáticas¹⁶. Aun así, existe un componente de influencia hereditaria para el cáncer esporádico, en general, y el de mama, en particular. El componente genético del cáncer de mama esporádico vendrá dado por la suma de efectos de múltiples genes de baja penetrancia y expresividad, que interaccionan entre sí y con el entorno, por lo que siguen un modelo de herencia cuantitativa o poligénica¹⁷.

La herencia cuantitativa o poligénica depende del fondo genético del individuo y constituye el componente hereditario del cáncer de mama con agregación familiar, pero también contribuye a la variabilidad en la penetrancia y expresividad del cáncer hereditario esporádico^{17,18}. El efecto poligénico parece estar mediado por la naturaleza hormonal, habiéndose descrito variantes de genes involucrados en el metabolismo de hormonas esteroideas (dentro de la familia del citocromo P450 como CYP17 y CYP19) y otros involucrados en el metabolismo de carcinógenos (CYPA1, N-acetil-transferasas NAT1 y NAT2)¹⁹.

Ambos tipos de cáncer de mama, tanto el hereditario como el esporádico surgen como consecuencia de la interacción entre el fondo genético y el ambiente. En el cáncer hereditario la influencia del fondo genético es muy fuerte, está constituida por la influencia de genes de alta penetrancia y expresividad alterados (generalmente supresores), y su influencia sobrepasa con mucho a la del ambiente. Otros de los factores de riesgo más importantes que se deben tener en cuenta son la edad, la situación geográfica²⁰ y los factores hormonales, especialmente los relacionados con eventos biológicos como la primera menarquia, la menopausia o la edad del primer embarazo^{16, 21}. Se han establecido incluso correlaciones entre la susceptibilidad de desarrollar cáncer de mama con factores ambientales o el estilo de vida, entre los que desatacan el consumo de alcohol y el sobrepeso u obesidad²².

Los indicadores pronósticos del cáncer de mama se han desarrollado en base a los estándares de valoración de parámetros del tumor como el tamaño, el tipo, el grado o el estado de los receptores. En los últimos años, se ha conseguido establecer una relación entre el perfil mutaciones de los tumores y la morfología observada, así como las moléculas y proteínas características de cada fenotipo. Todos estos factores se están mejorando para conseguir los métodos más seguros de predicción del comportamiento tumoral así como la respuesta y/o resistencia a un tratamiento²³.

1.2 Morfología y desarrollo de la glándula mamaria

Antes de describir las lesiones tumorales mamarias se describirá brevemente la morfología de la mama normal. Dado que nuestro estudio se ha llevado a cabo en un modelo murino de cáncer de mama, en este apartado se

resume la anatomía e histología comparadas de la glándula mamaria de ratón y humanos. Pese a las diferencias existentes entre las morfologías de ambas especies, el modelo de ratón es muy útil para entender el desarrollo y composición de la glándula mamaria y de manera consecuente la patología tumoral que ésta pueda desarrollar.

1.2.1 Anatomía comparada de la mama normal

Existen varias diferencias cuando se compara la anatomía de la glándula mamaria de humano y ratón. En primer lugar, a diferencia de las dos mamas existentes en humanos, los ratones cuentan con un total de cinco pares de mamas, las cuales se extienden desde las glándulas salivares hasta la región inguinal. Por otro lado, la mama humana cuenta con una estructura más compleja, formada por una red de pequeños ductos que se agrupan y extienden con un patrón radial para dar lugar a agrupaciones lobulares, cada una de ellas separada completamente de los lóbulos adyacentes²⁴. En el caso del ratón, las glándulas se constituyen por unidades lóbulo alveolares cuyos ductos terminan en yemas individuales denominadas TEBs (del inglés *Terminal End Buds*)²⁴. Estos ductos individuales son capaces de formar ductos secundarios, los cuales crecen con un patrón lineal a lo largo de la glándula mamaria del ratón. Las diferencias estructurales se hacen más patentes a nivel histológico, pues, a pesar de que en ambos casos el estroma mamario cuenta con gran cantidad de tejido adiposo, en los humanos se encuentra asociado con tejido conectivo fibroso, mientras que en ratón el tejido fibroso que se intercala con el adiposo es escaso²⁵.

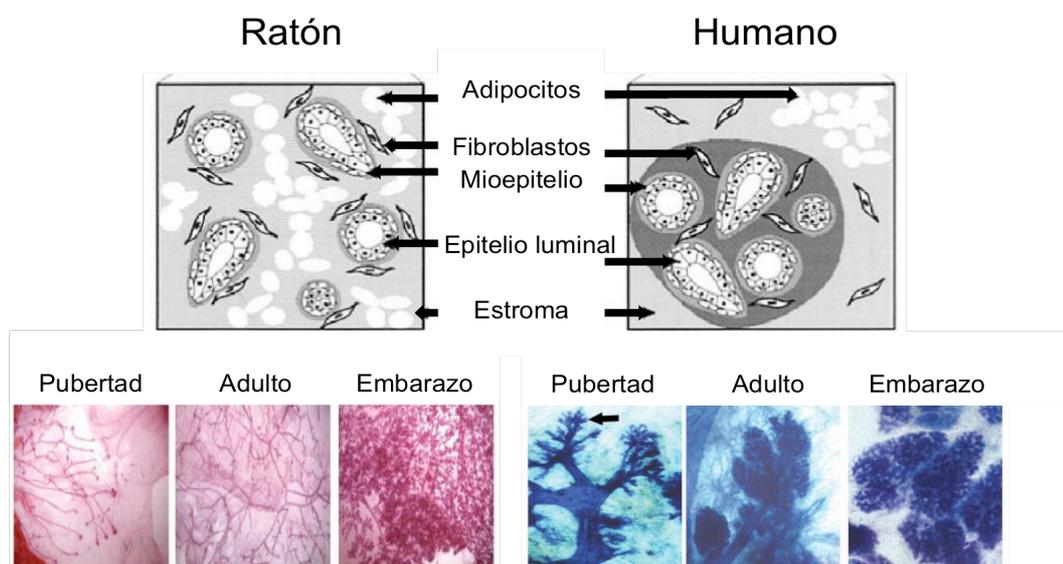


Figura 1. Comparación de la glándula mamaria de ratón y humano. Esquema superior: Estructura de la glándula mamaria. Imágenes inferiores: morfología de la glándula mamaria durante el desarrollo en ratón (izquierda) y humano (derecha).

Pese a estas diferencias en la glándula mamaria, ambas especies comparten similitudes en otra serie de aspectos relativos a su histología. En ambos casos la glándula mamaria consta de dos tipos celulares fundamentales, las células epiteliales denominadas lumbinales, que rodean el lumen central y las células de músculo liso denominadas mioepiteliales o basales, con características contráctiles que se encuentran rodeando a las anteriores y forman una capa basal^{26, 27}. Las células lumbinales se dividen en aquellas encargadas de formar el ducto, células ductales, y las alveolares, que tapizan el alveolo terminal y producen la leche durante la lactancia. Por último, una membrana basal, formada por las células mioepiteliales, separa el parénquima del mesénquima circundante o estroma en la glándula mamaria de ambas especies²⁷ (Fig. 1).

1.2.2 Desarrollo de la glándula mamaria

Los estadios del desarrollo de la glándula mamaria también presentan similitudes en humanos y ratones (Fig. 1). En el nacimiento las glándulas son rudimentarias y no es hasta la pubertad cuando los ductos de la mama comienzan a proliferar formando las estructuras arborizadas en respuesta a hormonas sexuales (estrógenos y progesterona)²⁸. La maduración total de la glándula no se produce hasta el embarazo, donde las células lumbinales proliferan extensivamente y se diferencian en alveolos secretores de leche. Finalmente, tras el periodo de lactancia, la glándula mamaria regresa a la estructura original mediante un programa apoptótico, por el cual se eliminan el 80% de las células generadas durante el embarazo²⁸. Además, a lo largo del proceso de desarrollo, la glándula mamaria tiene la habilidad de inducir la angiogénesis para proporcionar, a través del flujo sanguíneo, los suplementos necesarios²⁹.

Durante el proceso de desarrollo, la glándula mamaria sufre muchos de los procesos que suceden durante la progresión tumoral³⁰, como la invasión (crecimiento de los TEBs)²⁸, el reinicio de la proliferación (embarazo y lactancia) o la resistencia a la apoptosis y angiogénesis (protección de la mama frente a la involución prematura)²⁹.

1.3 Tipos de lesiones neoplásicas y clasificación del cáncer de mama

Las lesiones neoplásicas originadas en el tejido mamario se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios como la histopatología y el perfil de expresión genética.

1.3.1 Clasificación histopatológica del cáncer de mama

Las lesiones tumorales de la mama se pueden clasificar de manera general en lesiones benignas, las cuales se considera que surgen durante el proceso fisiológico evolutivo normal de la mama y las malignas. A pesar de su

denominación, las lesiones benignas pueden evolucionar a cáncer de mama y así, dependiendo del riesgo, se clasifican en lesiones no proliferativas (70% de los casos), lesiones proliferativas sin atipias (26%) y lesiones proliferativas con atipias (4%)³¹.

Las lesiones malignas a pesar de que pueden ocurrir en cualquiera de los tejidos que componen la mama, se dan con mayor frecuencia en el tejido epitelial glandular, por lo que estas lesiones se denominan adenocarcinomas. Los adenocarcinomas se pueden diferenciar en carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos infiltrantes. Mientras que los primeros se producen en las etapas tempranas del desarrollo tumoral y no llegan a sobrepasar la membrana basal, los segundos invaden el tejido que rodea a los conductos³¹.

A lo largo de la progresión tumoral, se generan en el tumor primario un conjunto heterogéneo de poblaciones celulares o subclones, alguno de los cuales adquieren la capacidad de metastatizar a un tejido u órgano a distancia, dando lugar a focos tumorales secundarios. En el caso de los pacientes con cáncer de mama, la metástasis se produce fundamentalmente en el hueso, el pulmón y el hígado³². La formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso crucial para el crecimiento del tumor primario sólido y para la metástasis, ya que además de proporcionar nutrientes, es una vía de acceso de las células tumorales que permite su diseminación. Es por ello que la vascularización se correlaciona con un fenotipo invasivo y de mayor agresividad³⁰.

El grado histológico de los tumores de mama es un factor importante para determinar el pronóstico de los pacientes. El sistema más recomendado para determinar el grado histológico es el de Elston-Ellis en el que atendiendo a la apariencia general del tumor (formación tubular), el pleomorfismo nuclear y el índice mitótico se clasifica a los tumores en grados I, II y III, en estrecha correlación con la diferenciación tumoral³³.

1.3.2 Clasificación del cáncer de mama según el perfil de expresión génica

Desde el punto de vista molecular, el cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea. Los avances en la identificación de las alteraciones bioquímicas, moleculares y genéticas en las células neoplásicas, han permitido el desarrollo de nuevos marcadores tumorales en función de los cuales se agrupa el cáncer de mama en cinco subtipos diferentes^{34, 35}. Las diferencias en los subtipos tumorales pueden ser consecuencia de alteraciones genómicas o diferencias respecto a la célula de origen y son indicativas de las diferencias en la biología celular de cada tumor que se reflejan en su comportamiento clínico en cuanto a las recidivas y la supervivencia global de los pacientes³⁴.

Uno de los mayores factores discriminantes del tipo de cáncer de mama es la presencia o ausencia de expresión proteica del receptor de estrógenos α (ER- α), lo que permite clasificar el cáncer de mama en dos grupos, ER positivo y ER

negativo³⁴.

a) **Cáncer de mama ER-positivo.** Los tumores de mama ER-positivos comprenden un espectro de tumores con diferentes propiedades proliferativas y perfiles de expresión génica. Dentro de estos tumores se pueden distinguir dos subgrupos:

- **Luminal A.** Se caracteriza por ser positivo para receptores hormonales de estrógenos y progesterona (PR), y negativo para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (HER2). Además presenta una alta expresión de genes característicos de las células luminales no neoplásicas y se considera un tumor de buen pronóstico³⁶.
- **Luminal B.** Este subtipo tumoral presenta el mismo patrón de expresión de receptores que el luminal A³⁷, aunque tiene una expresión moderada de genes específicos de células luminales y se diferencia del anterior por tener un fenotipo con mayor proliferación, más agresivo y, en general, de mayor grado histológico³⁴.

b) **Cáncer de mama ER-negativo.** Dentro de este tipo de tumores se incluyen tres subtipos moleculares:

- **Basal-like.** Es un tipo tumoral muy heterogéneo en el que se encuentran representados entre el 20-25% de los cánceres de mama. Este tipo de tumores son clínicamente muy agresivos y comprenden tumores negativos tanto para los dos receptores hormonales (ER y PR), como para HER2 por lo que también se denominan triple negativos³⁶.
- **Claudin-low.** Este subtipo es similar al anterior y se denomina Claudin-low debido a la baja expresión de las proteínas claudina 3, 4 y 7. Otras características son la pérdida de expresión de los receptores ER, PR y HER2, así como la baja expresión de la proteína E-cadherina frente al enriquecimiento de marcadores de la transición epitelio-mesénquima (EMT). El perfil de expresión génica de estos tumores es similar al de las células madre mamarias y las células madre del tumor de mama³⁷.
- **HER2-positivo.** Este tipo de cáncer de mama se caracteriza por expresar el receptor HER2, también conocido como ErbB2³⁸. La amplificación del gen que codifica el receptor se encuentra en un 15-30% del cáncer de mama. Estos tumores tienen un comportamiento clínico más agresivo, con períodos de recidiva y supervivencia más cortos, aunque el tratamiento con inhibidores específicos de ErbB2 está modificando esta tendencia. A continuación describiremos este tipo de tumor en más detalle dada su relevancia en el estudio realizado en esta tesis doctoral.

1.4 Cáncer de mama HER2/ErbB2 positivo

HER2/ErbB2, cuyo homólogo en roedores se denomina Neu, es un receptor de membrana que pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa ErbB, cuyos miembros son: EGFR/HER1/ErbB1/, HER2/ErbB2/Neu, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4³⁸. La estructura de todos los miembros consta de una región extracelular que une el ligando, generalmente miembros de la familia de los factores de crecimiento epidérmico (EGF), una región transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa³⁹ (Fig. 2).

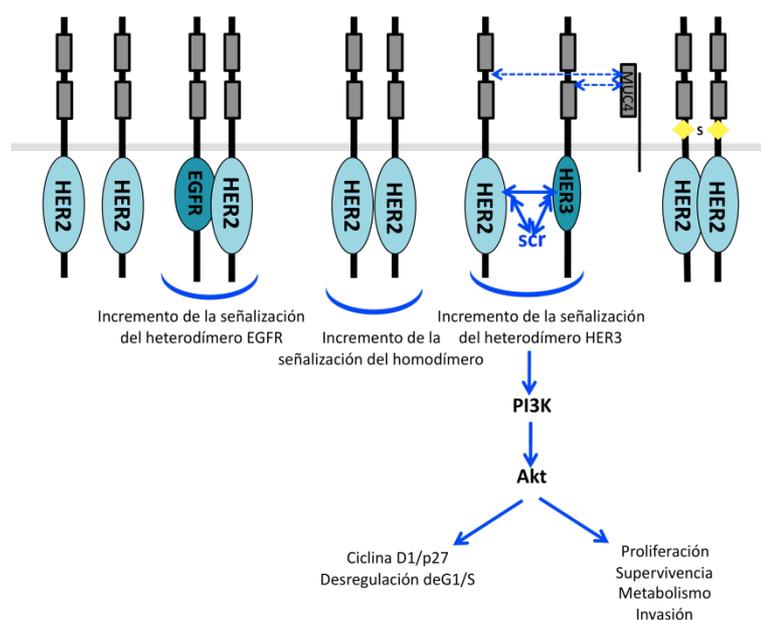


Figura 2. Receptores HER2 en cáncer de mama. Estructura de los receptores HER y asociaciones entre HER2 y los miembros de esta familia de receptores en cáncer de mama. La dimerización entre los receptores puede ser de tipo heterodimérica (EGFR/HER2; HER2/HER3) o bien homodimérica (HER2/HER2). Los heterodímeros HER2/HER3 son los que presentan mayor actividad e inducen la proliferación, supervivencia e invasión. (Figura modificada de Moasser, 2007³⁸).

La unión del ligando induce la dimerización de los receptores HER y la transfosforilación de sus dominios intracelulares. Aunque la dimerización puede ocurrir entre dos receptores HER diferentes (heterodimerización) o entre dos moléculas del mismo receptor (homodimerización) son los heterodímeros los que tienen una mayor actividad. Los heterodímeros entre los receptores HER se producen en la mayoría de los casos en combinación con HER2, el cual, al no tener ligando conocido, necesita unirse a otros receptores de la familia de HER unidos a ligando para activar su función quinasa³⁸.

Como se mencionó anteriormente, un 15-30% de los tumores de mama tienen sobreexpresión de HER2⁴⁰, debido normalmente a amplificación génica, aunque también se ha descrito la sobreexpresión del receptor debida a una

mayor transcripción y la presencia de formas mutantes o truncadas del receptor que dan lugar a una elevada activación basal del mismo⁴¹. La sobreexpresión de HER2 ocasiona un incremento de heterodímeros formados por este receptor y HER1 o Her3⁴². Los dímeros HER1/HER2 poseen una menor tasa de degradación y por tanto se produce un aumento de la duración y potencia de la señalización³⁸. En cuanto al dímero HER2/HER3, se considera el heterodímero más potente con respecto a la fuerza de la interacción, la fosforilación de tirosina inducida por ligando y la señalización aguas abajo, siendo el más potente en términos de inducción de proliferación celular y capacidad transformante³⁸ (Fig. 2).

Los fenómenos protumorales inducidos por el incremento de la expresión de HER2 en tumores se deben a la hiperactivación de numerosas rutas de señalización que permiten a los dímeros formados por éste receptor modular una gran variedad de procesos celulares. La sobreexpresión de HER2 induce alteraciones del ciclo celular, en concreto en el checkpoint de G1/S, que conducen a la proliferación descontrolada propia de la tumorigénesis. Esta desregulación está producida por la sobreexpresión de ciclina D1, ciclina E y Cdk6, y un incremento de la degradación de p27³⁸. Los heterodímeros formados por HER2/EGFR promueven la pérdida de polaridad y de la adhesión celular mediante la activación de varias rutas entre las que se incluyen rutas reguladas por Ras, fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C γ (PLC γ)³⁸. Por último, se han descrito numerosas vías de señalización que contribuyen al fenotipo invasivo, como la activación de PI3K/Akt⁴³, Src y la quinasa de adhesión focal (FAK)⁴⁴, así como la inducción de la integrina β 4⁴⁵ y del factor de necrosis tumoral β (TGF- β)⁴⁶.

1.4.1 Modelos animales de cáncer de mama HER2 positivo: ratones MMTV-Neu

Una de las herramientas más empleadas en los últimos años para analizar los mecanismos moleculares responsables de la aparición y desarrollo del cáncer de mama son los ratones modificados genéticamente. Existen varios modelos de ratón en los que se ha conseguido mimetizar el cáncer de mama HER2 positivo. El modelo de ratón utilizado para este estudio corresponde con la amplificación o sobreexpresión del protooncogén *ErbB2/Neu* de rata. *Neu* codifica una proteína de 185 kDa homóloga al receptor HER2 en humanos, como se ha explicado anteriormente. En el modelo de ratón MMTV-Neu la sobreexpresión de Neu en el epitelio mamario se consiguió introduciendo el gen *Neu* bajo el control del promotor del virus de tumor de mama de ratón (MMTV).

Los estudios realizados en este modelo de ratón demuestran que la sobreexpresión de la proteína Neu tiene un elevado potencial oncogénico capaz de transformar las células del epitelio mamario. Entre las diferentes características tumorigénicas observadas cabe destacar el aumento de la

actividad tirosina quinasa en los tejidos tumorales frente a la actividad del epitelio mamario adyacente. Además, los ratones MMTV-Neu desarrollan metástasis pulmonares indicando que la sobreexpresión de Neu confiere un incremento del potencial metastásico a la célula tumoral⁴⁷. Dadas estas características, los ratones MMTV-Neu se han utilizado en numerosos estudios de tumorigénesis *in vivo* que han permitido identificar muchas de las proteínas relevantes en los diferentes estadios de la progresión tumoral en cáncer de mama.

2. Rho GTPasas

Las GTPasas de la familia Rho regulan numerosos procesos celulares que están alterados en el cáncer, como son la motilidad celular, proliferación, supervivencia y diferenciación celular. De hecho, la activación anómala de las Rho GTPasas está estrechamente relacionada con la transformación celular, angiogénesis, invasión y metástasis. En tumores de mama es frecuente la sobreexpresión e hiperactivación de las proteínas Rho, lo que indica la importancia de estas proteínas en el desarrollo y progresión del cáncer de mama⁴⁸.

Las Rho GTPasas son una de las cinco familias que constituyen la superfamilia Ras⁴⁹, también conocidas como GTPasas pequeñas debido a su bajo peso molecular, de alrededor de 21 kDa⁵⁰. El primer miembro de esta familia fue descubierto en *Aplysia* en una búsqueda de proteínas homólogas a Ras, por lo que se denominó Rho (*Ras homology*). Posteriormente se identificaron 23 miembros de la familia Rho en humanos que se clasifican en seis subfamilias: RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2 y RhoBTB3), Rnd (Rnd1, Rnd2 y RhoE/Rnd3), Miro (Miro1 y Miro2) y las tres mejor caracterizadas, Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rac (Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG) y Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp/Wrch2 y Wrch1) Además se incluyen RhoD, Rif y TTF/RhoH que constituyen un grupo heterogéneo que no puede ser clasificado dentro de ninguna de las subfamilias anteriores^{11, 51, 52}. Las proteínas Rho GTPasas están altamente conservadas en todas las especies eucariotas⁵² (Fig. 3).

Con alguna excepción, la familia de Rho GTPasas presentan el motivo CAAX en el extremo carboxilo terminal⁵³. Esta región sufre modificaciones postraduccionales que consisten en la prenilación por adición de un grupo isoprenilo, farnesilo o geranilgeranilo, que puede seguir de una modificación posterior por palmitoilación dependiendo de la GTPasa. Estas modificaciones postraduccionales actúan como anclajes lipídicos y permiten a las Rho GTPasas asociarse a membranas específicas, donde realizan su función.

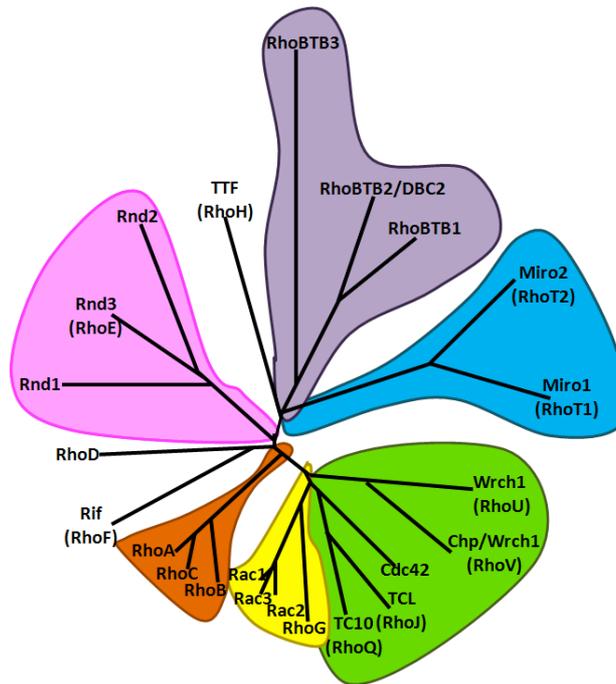


Figura 3. Árbol filogenético de las GTPasas de la familia Rho. Las seis subfamilias de las Rho GTPasas se muestran en diferentes colores. Incluye seis subfamilias: Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB y Miro; y tres proteínas sin clasificar TTF (RhoH), RhoD y Rif (RhoF). (Figura modificada de *Ellenbroek y Collard, 2007*⁵⁴)

2.1 Regulación de las Rho GTPasas

Al igual que Ras, los miembros de casi todas las subfamilias de Rho actúan como “interruptores moleculares” con las excepciones de RhoBTB y Miro, que son considerados atípicos, por poseer una regulación diferente al resto de la familia^{53, 55, 56}. Las Rho GTPasas regulan su estado de activación mediante la unión de guanosinas-trifosfato (GTP) (estado activo) o guanosinas difosfato (GDP) (estado inactivo). La afinidad de las Rho GTPasas por GDP y GTP es muy elevada (del orden de nanomolar a picomolar), por lo que el equilibrio de disociación de los nucleótidos es muy lento. Asimismo, la reacción de hidrólisis de GTP por estas proteínas es muy lenta. En consecuencia, las Rho GTPasas requieren la participación de proteínas reguladoras que permiten llevar a cabo la fluctuación entre el estado activo e inactivo de manera eficiente. Existen tres tipos de proteínas reguladoras, los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina o GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*), las proteínas activadoras de la actividad GTPasa o GAPs (*GTPase Activating Proteins*) y los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina o GDIs (*Guanine Dissociation Inhibitors*)⁵⁷ (Fig. 4).

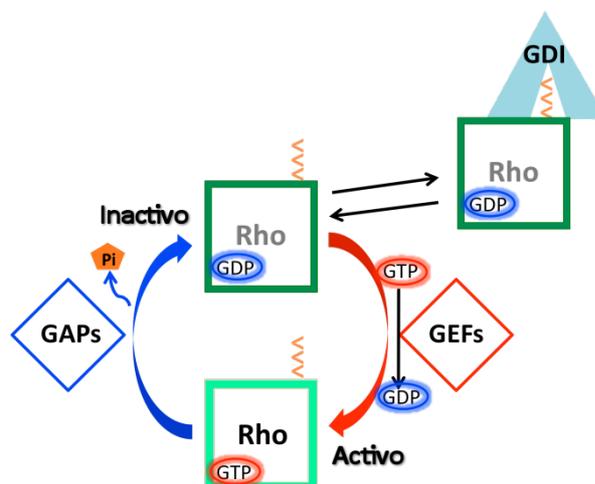


Figura 4. Ciclo de activación e inactivación de las Rho GTPasas. Las proteínas Rho unidas a GDP (forma inactiva) se encuentran en el citoplasma, secuestradas por las proteínas GDI, que previenen su activación por parte de los GEFs. Después de translocarse a la membrana plasmática, los GEF se encargan de estimular el intercambio de GDP a GTP (forma activa), pudiendo unirse a sus efectores para dar lugar a la activación de las vías de señalización aguas abajo. Las proteínas GAP favorecen la hidrólisis del nucleótido GTP a GDP, volviendo las proteínas Rho a su forma inactiva.

Los GEFs promueven el intercambio de GDP por GTP, dando lugar a la activación de las Rho GTPasas⁵⁸. Se conocen en torno a 70 Rho-GEFs, que se pueden clasificar en dos subgrupos en función de su dominio catalítico. En el primero, el más numeroso, encontraríamos los GEFs que poseen un dominio catalítico DH (*Difuse B Cell Lymphoma Homology*) que se encuentra siempre en tandem con un dominio PH (*Pleckstrin Homology*). En el segundo grupo de GEFs la actividad catalítica se realiza por el dominio DHR2 (*Dock Homology Region 2*)^{21, 59, 60}. Además los GEF poseen otros dominios cuya finalidad es determinar la ruta de señalización que se activará por debajo de la proteína Rho GTPasa (mediante la unión a diferentes moléculas efectoras) o bien sirven de andamio para éstas⁶¹⁻⁶³. Se conocen tanto GEF específicos de una sola proteína GTPasa, como otros capaces de actuar sobre múltiples GTPasas^{54, 64-68}.

Las proteínas GAPs, favorecen la actividad GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas sobre las que actúan lo que permite hidrolizar GTP en GDP, revirtiendo el estado activo en uno inactivo. De este tipo de proteínas reguladoras se conocen alrededor de 60 miembros⁶⁹⁻⁷¹. La especificidad de sustrato de las GAPs también varía ampliamente, de forma que algunas de ellas regulan a una sola proteína Rho mientras que otras actúan sobre diferentes sustratos (Fig. 5). Como en el caso de los GEFs, las GAPs son proteínas multidominio, capaces de modular la asociación con múltiples proteínas⁵⁷.

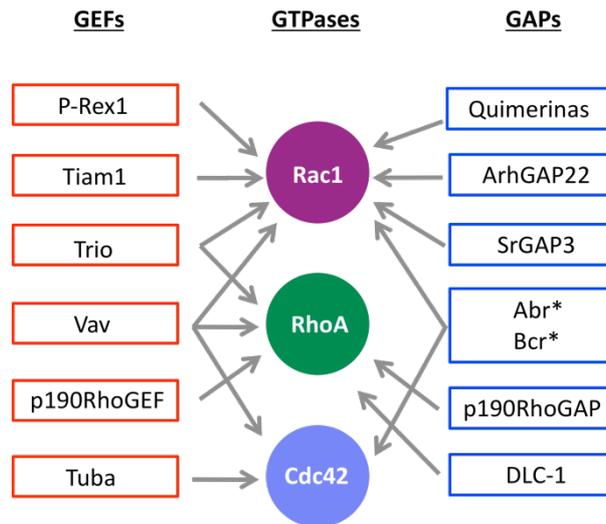


Figura 5. Moduladores GEFs y GAPs de la familia de Rho GTPasas en cáncer de mama. Las proteínas reguladoras, GEFs y GAPs, de la familia de Rho GTPasas pueden ser específicas de una proteína Rho o de varios miembros.

El hecho de que el número de GAPs y GEFs sobrepase ampliamente el número de Rho GTPasas indica que cada una de estas proteínas reguladoras debe jugar un papel especializado en la regulación específica de determinadas GTPasas, siendo los GEFs y GAPs los responsables de ejecutar la activación de las GTPasas en el tiempo y localización específicos.

En cuanto a los GDIs, de los que hasta el momento se han identificado tres miembros en mamíferos (RhoGDI-1, RhoGDI-2 y RhoGDI-3), son proteínas citosólicas capaces de crear un complejo inactivo con las proteínas Rho unidas a GDP. Esta unión a los GDI impide el intercambio de nucleótidos de guanina y además provoca la salida de las Rho GTPasas de las membranas, impidiendo su activación por los GEFs y la interacción con sus efectores^{72, 73}.

2.2 Funciones de las Rho GTPasas

Las funciones moduladas por las Rho GTPasas son el resultado de múltiples y diferentes interacciones entre los miembros esta familia. El control de estas funciones se produce principalmente mediante la regulación de su actividad (vía GEFs, GAPs o GDIs), la regulación de la expresión y estabilidad de estas proteínas o bien por la regulación de las vías de señalización que controlan⁷⁴. A continuación se describirán las principales funciones reguladas por las Rho GTPasas.

2.2.1 Regulación del citoesqueleto

La función principal de las GTPasas de la familia Rho es el control de la reorganización del citoesqueleto de actina. De hecho, la formación de las

principales estructuras del citoesqueleto de actina; fibras de estrés, lamelipodios y filopodios están reguladas por RhoA, Rac y Cdc42 respectivamente⁷⁵.

Las Rho GTPasas controlan tanto la cantidad como el sitio de polimerización de actina a través de la regulación del ensamblaje de los monómeros de actina. Los monómeros globulares de actina (actina G) se unen cabeza con cola, generando polaridad en la estructura para formar los largos polímeros filamentosos de actina (actina F). Existen dos tipos de polimerización de la actina y cada uno de ellos posee una proteína principal específica encargada de llevarlos a cabo. La proteína promotora de la formación de filamentos lineales se denomina DRF (*Diaphanous-related formin*), mientras que el complejo que dirige la ramificación de los filamentos es Arp2/3⁷⁶. El complejo Arp2/3 se une a los lados de filamentos preformados para iniciar el crecimiento de nuevos filamentos en ángulos de 70° respecto al inicial⁷⁷. Ambos factores aumentan la tasa de polimerización favoreciendo el paso limitante de la misma, que es la nucleación, seguido de la fase rápida de elongación. Tanto Cdc42 como Rac pueden controlar la activación de Arp2/3. Sin embargo, mientras que Cdc42 activa Arp2/3 a través de su efector WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*), la activación dependiente de Rac está relacionada con la estructura SCAR/WAVE (*Suppressor of cAMP receptor/WASP family Verprolin-homologous protein*)^{77, 78}. A diferencia de Rac y Cdc42, RhoA estimula la polimerización de actina en filamentos lineales principalmente mediante las DRFs⁷⁹ (Fig. 6).

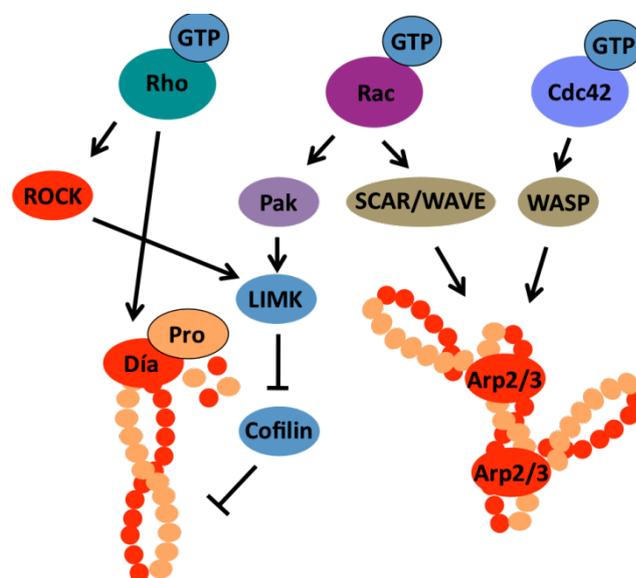


Figura 6. Esquema de la regulación de la formación de filamentos de actina mediada por Rho, Rac y Cdc42. Rho media la formación de filamentos de actina lineales a través de la proteína DRF. La formación de filamentos ramificados de actina se encuentra regulada por el complejo Arp2/3 que es controlado tanto por Rac como Cdc42 a través de dos proteínas específicas diferentes denominadas Scar/WAVE y WASP respectivamente. (Figura modificada de *Mulinari y Häcker, 2010*⁷⁶)

RhoA, a través de su efector principal ROCK (*Rho-associated kinase*), activa la cadena ligera de miosina (MLC, *myosin light chain*) por fosforilación e incrementa tanto la contracción celular como la presencia de fibras de estrés⁸⁰. Así mismo, ROCK controla la dinámica de los filamentos de actina mediante la activación de la proteína LIMK (*LIM kinase*)⁸¹. En respuesta a la activación de ROCK, LIMK inactiva por fosforilación a la proteína cofilina⁸¹, lo cual conlleva una reducción en el proceso de creación de filamentos de actina y por tanto favorece la estabilización de los filamentos. Por otra parte, el efector LIMK actúa por debajo de la proteína PAK (*p21-activated kinase*), el efector que comparten de Rac y Cdc42, de manera que se inhibe la polimerización de actina⁸². Por lo tanto, todos estos procesos dinámicos del citoesqueleto están regulados de manera coordinada e interconectada por las diferentes vías de señalización que se encuentran por debajo de las Rho GTPasas (Fig. 6).

Además de regular el citoesqueleto de actina, las Rho GTPasas son importantes reguladores del citoesqueleto de microtúbulos. RhoA a través de su efector mDia es capaz de alinear los microtúbulos del citoesqueleto⁸³, de la misma manera que Rac y Cdc42 median su estabilización vía PAK⁸⁴. Además Rac1 y Cdc42 pueden retener los microtúbulos en el córtex de la célula facilitando la migración celular. Esta retención es necesaria para la estabilización de los microtúbulos y para la polarización de las células^{61, 85, 86}.

A través de su función en el control del citoesqueleto, las Rho GTPasas participan en la regulación de las uniones celulares. Estas uniones pueden establecerse entre dos células o entre la célula y la matriz extracelular (ECM). Existen varios tipos de uniones intercelulares entre las que destacan las uniones estrechas (TJ, *tight junction*), las uniones adherentes (AJ, *adherens junction*), los desmosomas y las uniones GAP. Las uniones intercelulares son un componente esencial en la morfología y función epitelial. Estas estructuras adhesivas están conectadas con el citoesqueleto⁸⁷. En el caso de las adhesiones estrechas y las uniones adherentes lo hacen a través de microfilamentos, mientras que los desmosomas lo hacen mediante filamentos intermedios. Las Rho GTPasas participan fundamentalmente en la formación, mantenimiento y desestabilización de las AJ y TJ⁸⁸ (Fig. 7).

Las uniones de la célula con el sustrato se denominan adhesiones focales y son estructuras importantes para la motilidad celular. Las GTPasas RhoA y Rac muestran funciones opuestas durante la formación de este tipo de adhesiones. Rac se encarga de la formación de las adhesiones nacientes (< 5 μm), para lo que acopla la formación de estas adhesiones con la formación de lamelipodios. Por el contrario, RhoA se encarga de la maduración, promoviendo cambios en la composición y la longitud de las adhesiones (> 1 μm), ambos procesos implicados en la contracción celular⁷⁴ (Fig. 7).

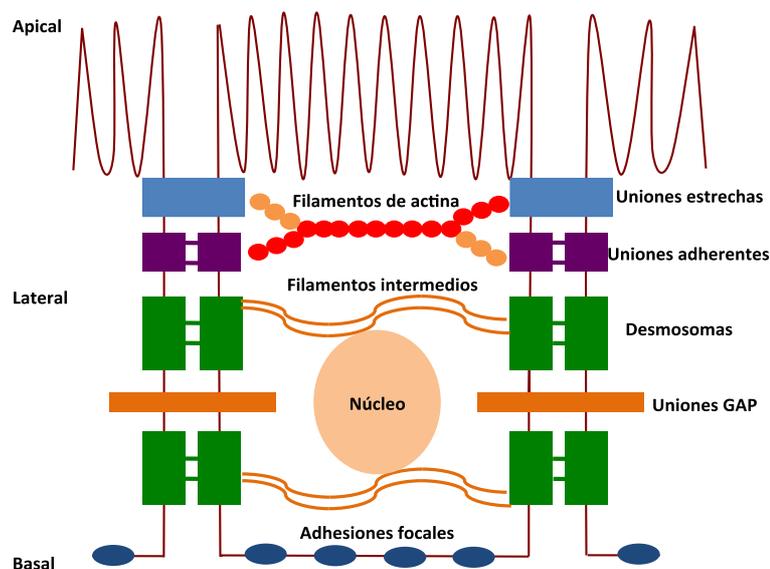


Figura7. Esquema de las adhesiones celulares. Las uniones estrechas (TJ) y las adherentes (AJ) tienen como función principal las conexiones intercelulares y se encuentran asociadas con el citoesqueleto de actina. Las uniones GAP y los desmosomas se encargan del mantenimiento de la polaridad celular y en el caso de éstos últimos conectan las adhesiones con los filamentos intermedios. Finalmente, las adhesiones focales son uniones que establece la célula con el sustrato o ECM (Figura modificada de *Malliri et al, 2011*⁸⁹)

Numerosos procesos celulares dependen del citoesqueleto y por lo tanto están bajo la influencia de las Rho GTPasas como son el tráfico vesicular, la fagocitosis⁹⁰⁻⁹², la migración, la morfogénesis y la citoquinesis^{93,63,64}. Estos procesos son muy importantes para la correcta funcionalidad de las células y son cruciales en los procesos que ocurren durante el desarrollo, con especial relevancia durante el desarrollo del sistema nervioso^{94, 95}.

2.2.2 Regulación de la expresión génica, ciclo celular y supervivencia

Diversos miembros de la familia de las Rho GTPasas tienen un papel en la regulación de la transcripción genética y pueden controlar genes implicados en la progresión del ciclo celular y la proliferación⁹⁶. Además, la familia de las Rho GTPasas es capaz de mediar en los procesos de supervivencia celular a través de la modulación de la apoptosis^{97, 98}.

Las Rho GTPasas contribuyen a la progresión del ciclo celular regulando los niveles de la ciclina D1 y de inhibidores de las Cdk. La transcripción de la ciclina D1 está controlada por los factores transcripcionales ETS, AP-1 y el factor nuclear NF- κ B⁹⁷. Numerosos estudios han identificado vías de señalización que unen a las Rho GTPasas con estos factores de transcripción⁹⁹. El factor AP-1 es un heterodímero formado por proteínas de las familia FOS, JUN y ATF. Rac1 y

Cdc42 a través de la activación de JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) y p38 (*p38 Mitogen Activated Protein Kinase*) son capaces de activar AP-1¹⁰⁰. Uno de los efectores mejor caracterizados de Rac y Cdc42 que se han implicado en la activación de JNK y p38 es PAK¹⁰¹. RhoA por su parte puede incrementar la transcripción de JUN y FOS, los componentes de AP-1, tras activar los factores de transcripción MEF2C y el factor de respuesta a suero (SRF, *Serum Response Factor*)¹⁰². Como ocurre con Rac1 y Cdc42, la activación de AP-1 por RhoA implica a p38. La transcripción del factor NF-κB puede ser activado por Rac1 a través de su capacidad de producir ROS (*Reactive Oxygen Species*)⁹⁹ o mediante la regulación del inhibidor de la quinasa κB (IKK)¹⁰³. Además, otro mecanismo por el cual las Rho GTPasas pueden promover un nivel mayor de ciclina D1 es a través de la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2)¹⁰⁴.

Respecto a la regulación que las Rho GTPasas realizan sobre la apoptosis, existe dualidad en el papel que estas desempeñan, ya que modulan tanto la señalización proapoptótica como la antiapoptótica así como el proceso en sí¹⁰⁵. Rac1 puede proteger a las células de la apoptosis mediante la producción de ROS y la subsecuente activación de NF-κB¹⁰⁶. Por el contrario, en otros contextos las Rho GTPasas pueden favorecer la apoptosis. Por ejemplo, RhoB es capaz de inducir la apoptosis en respuesta a daños producidos en el DNA o tras la inhibición de la farnesiltransferasa¹⁰⁷, mientras que la activación de Rac es necesaria para la inducción de la apoptosis inducida por FAS¹⁰⁸.

2.3 Rho GTPasas y cáncer de mama

La progresión tumoral implica alteraciones en varios de los procesos celulares descritos anteriormente que están controlados por las GTPasas de la familia Rho. De hecho, la señalización mediada por estas proteínas está alterada en tumores de mama humanos y existe una correlación entre la expresión elevada y/o hiperactivación de varias Rho GTPasas con distintas etapas de la progresión tumoral, metástasis y con un peor pronóstico (Fig. 8).

RhoA se encuentra sobreexpresado en tumores de mama humanos, siendo los niveles de expresión más elevados en las metástasis que en los tumores primarios. Asimismo, la expresión de un microRNA que suprime la transcripción de RhoA (mir-31), se correlaciona de manera inversa con metástasis, tanto en líneas celulares de cáncer de mama como en tumores humanos¹⁰⁹. Estos datos sugieren que la alteración de la señalización mediada por RhoA influye en los estadios más avanzados del cáncer de mama.

RhoC también está sobreexpresado en tumores de mama y, al igual que RhoA, los niveles de expresión se correlaciona de manera positiva con la progresión tumoral¹¹⁰. Además, esta GTPasa está notablemente sobreexpresada en cáncer de mama inflamatorio, un tipo de cáncer caracterizado por su rápida progresión hacia formas invasivas y altamente metastásicas.

Cdc42 se encuentra sobreexpresado e hiperactivado en tumores de mama invasivos en comparación con su expresión en tejido normal del mismo paciente¹¹¹. Esta GTPasa es un regulador clave en la formación de los invadopodios y además su sobreexpresión induce la pérdida de polaridad celular, promueve la motilidad celular y estimula la actividad tanto de PI3K como de ERK. Por lo tanto Cdc42 puede participar en prácticamente todas las fases de la progresión tumoral.

Por último, Rac1 también puede contribuir al desarrollo del cáncer de mama a través de múltiples mecanismos. De hecho, esta GTPasa también se sobreexpresa en tumores de mama y parece tener un papel relevante en los estadios tempranos de la tumorigénesis¹¹². Dada la relevancia que esta GTPasa tiene en esta tesis doctoral, en el siguiente apartado se explicarán en profundidad las características de esta GTPasa y su papel en cáncer de mama.

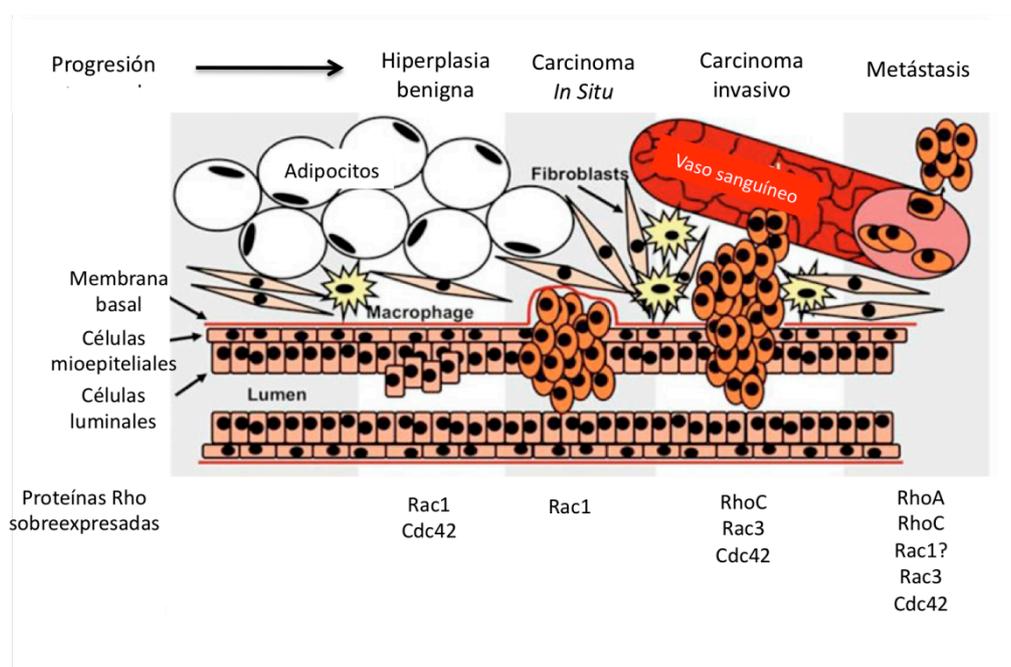


Figura 8. Modelo hipotético de las Rho GTPasas implicadas en cada estadio de la progresión del cáncer de mama. (Figura modificada de McHenry y Vargo-Gogola, 2011⁴⁸)

3. Las GTPasas Rac

La subfamilia Rac de GTPasas está compuesta por los miembros Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG. Las isoformas de Rac guardan un alto grado de homología entre ellas, presentando las mayores divergencias en el extremo C-terminal, región que es importante tanto para la localización subcelular como para la unión a reguladores específicos¹¹³⁻¹¹⁵. Mientras que Rac1 y RhoG son ubicuas, la isoforma Rac2 se encuentra silenciada en todas las células excepto en las

hematopoyéticas (macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B)^{88, 89, 116-118}. Por su parte, Rac3 se expresa principalmente en cerebro, aunque también se ha descrito su expresión en algunas líneas celulares, de las que cabe destacar DU4475 (células de cáncer de mama)¹¹⁴.

Las proteínas Rac se asocian a la membrana para llevar a cabo sus funciones. Esta asociación a la membrana no se produce en el momento de la biosíntesis, sino que es mediada por las modificaciones postraduccionales que se dan sobre la denominada caja "CAAX" por la incorporación de grupos geranil-geranilo o del grupo farnesilo, aunque este último en menor frecuencia¹¹⁹.

3.1 Regulación de Rac

La regulación de Rac se produce de manera semejante al resto de subfamilias de las Rho GTPasas, mediante la actuación de GEFs, GAPs y GDIs específicos como ya se ha explicado en la sección anterior. Rac puede ser activado por un variado número de estímulos, entre los que se incluyen factores de crecimiento (EGF, PDGF, HRG), ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G Protein Coupled Receptors*) (SD-1 α , esfingosina fosfato y bombesina), integrinas y señales de estrés. Tras la estimulación de los receptores correspondientes, Rac se activa mediante la activación de RacGEFs, normalmente mediante la participación de moléculas intermedias¹²⁰. Asimismo, la inactivación de Rac también puede estar controlada mediante la estimulación de receptores que regulan a proteínas GAP, como es el caso de la quimerinas^{121, 122}.

Un mecanismo adicional de regulación que es específico de las GTPasas Rac es su capacidad de autoasociación. A diferencia de RhoA y Ras, los cuales sólo existen en monómeros, Rac1 y Rac2 pueden encontrarse formando homodímeros u oligómeros¹²³. La auto asociación de Rac está mediada por su región C terminal polibásica. A pesar de que no se conoce en profundidad el significado biológico de esta asociación, se sabe que su actividad GTPasa intrínseca está favorecida en estas condiciones¹²⁴.

Rac también se puede regular mediante el control de los niveles de proteína. Se ha comprobado que los niveles de Rac se controlan mediante varios procesos que regulan su degradación. Así, se ha demostrado que Rac puede sufrir ubiquitinización¹²⁵ y sumoilación¹²⁶. Además, Rac puede ser degradado por la caspasa-3¹²⁷. La rotura de Rac1 y Rac2 mediada por la caspasa se realiza en las posiciones Asp11 y Gly12 respectivamente, ambas secuencias poco convencionales de reconocimiento de la caspasa-3. El corte de ambas GTPasas tiene como resultado la inactivación irreversible de las mismas, impidiendo su unión a GTP así como la interacción con sus efectores. La unión de Rac al GDI protege a la GTPasa de la acción de la caspasa¹²⁸. Esta

degradación mediada por caspasas añade más complejidad a la regulación de las funciones de Rac, especialmente a las relacionadas con la apoptosis¹²⁹.

3.2 Funciones celulares de Rac

A pesar de que la función principal de Rac es la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina, fundamentalmente para la formación de lamelipodios y ruffles de la membrana, Rac participa en muchos otros procesos. Algunos de ellos están relacionados el citoesqueleto, como son el mantenimiento de la morfología celular, la polaridad, la adhesión y la migración, y otros muchos no, como es el caso de la producción de ROS, la transcripción de genes, la progresión del ciclo celular, la supervivencia y la apoptosis (Fig. 9).

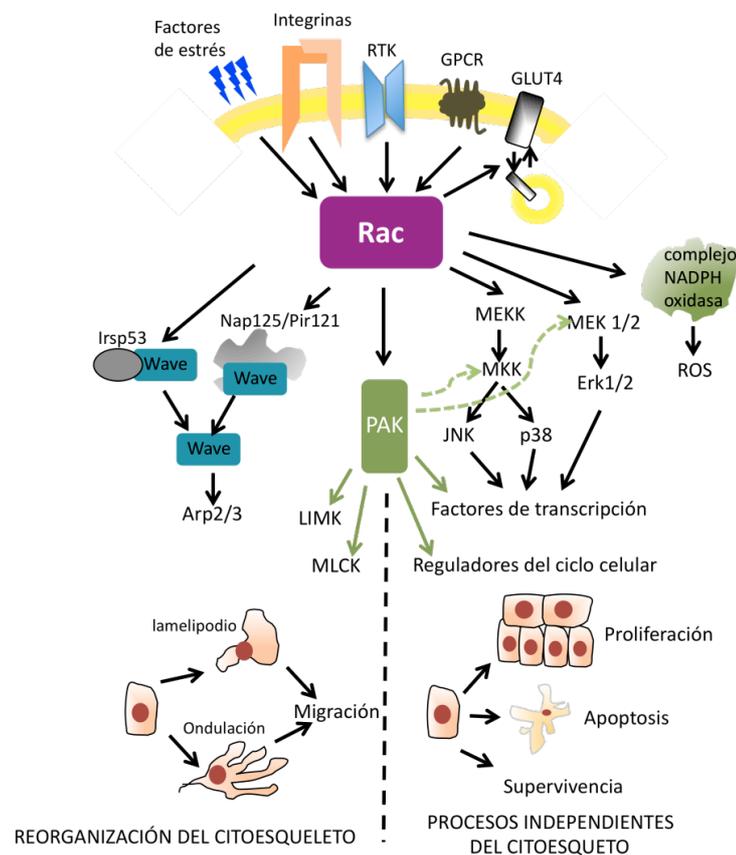


Figura 9. Diferentes funciones celulares reguladas por Rac. Rac participa en la regulación de funciones dependientes e independientes del citoesqueleto de actina a través de la activación de múltiples efectores. Mediante el control de la polimerización del citoesqueleto de actina controla la formación de las estructuras de membrana necesarias para la migración celular (lamelipodios y ondulaciones de membrana o *ruffles*). Entre las funciones no dependientes del citoesqueleto se encuentran el control de la proliferación, la transcripción de genes mediadores de la supervivencia celular o de la apoptosis, la producción de ROS o incluso la regulación del transportador de glucosa GLUT4. (Figura modificada de Wertheimer *et al.* 2011¹³⁰)

3.2.1 Función de Rac en la reorganización del citoesqueleto de actina

La organización del citoesqueleto a través de Rac esta mediada por dos vías, una directa mediante la unión a PAK y otra indirecta a través de Arp2/3.

- **PAK.** PAK fue el primer efector descrito para Rac1. Se trata de una serina/treonina quinasa, que se une directamente a RacGTP o Cdc42GTP a través del dominio PBD (*p21 Binding Domain*)¹³¹ y cuya unión estimula potentemente la actividad quinasa de PAK. Existen seis isoformas de PAK identificadas en humanos clasificadas en dos grupos (I y II). Los miembros del grupo I (PAK 1, 2 y 3) contienen el dominio PBD y un dominio auto-inhibitorio. Los del grupo II (PAK 4, 5 y 6) poseen únicamente el dominio PBD. Otra diferencia significativa entre ambas clasificaciones es el modelo de activación. Mientras las isoformas de PAK I son activadas después de la unión con Rac y Cdc42, las de PAK II no requieren de la GTPasa para llevar a cabo su actividad quinasa, pero su interacción con Rac/Cdc42 afecta a la localización subcelular de la proteína¹³².
- **Arp2/3.** Como ya se ha mencionado anteriormente, Rac, junto con Cdc42, se encargan de los procesos relacionados con la polimerización de actina en estructuras ramificadas, para lo cual utilizan el complejo Arp2/3. Rac actúa sobre el complejo Arp2/3 mediante de su proteína efectora Scar/WAVE para controlar la formación de lamelipodios. La unión de Rac a WAVE no es directa, al no contar esta proteína efectora con un dominio PBD⁷⁸. Esta ausencia del dominio PBD la caracteriza por un estado constitutivamente activo. Para su inhibición es necesario otro complejo formado por cuatro proteínas (Nck+PIR121+Nap1+Abi). Tras la activación en membrana de Rac por unión a GTP, es posible la disociación del complejo inhibitor de Scar/WAVE, induciéndose la formación de lamelipodios¹³³.

3.2.1.1 Formación de lamelipodios

La formación de lamelipodios se produce como respuesta a la estimulación extracelular capaz de mediar la activación de la GTPasa Rac. La asociación consecuente con sus moléculas efectoras Scar/WAVE y Arp2/3 media el ensamblaje de las unidades de actina del citoesqueleto, las cuales componen los filamentos de las estructuras denominadas lamelipodios. El sistema de crecimiento dinámico de los filamentos de actina, debido al ensamblaje y desensamblaje de los filamentos, proporciona el movimiento de expansión de la membrana celular característico de estas estructuras (Fig. 10). Existen varias fases implicadas en este proceso. La fase inicial de nucleación o ensamblaje se caracteriza por la polimerización de subunidades de actina unidas a ATP, que se hidroliza a ADP al irse desplazando los monómeros de actina a lo largo del filamento hacia el extremo. El desensamblaje de los filamentos de actina es un proceso en el que interviene el complejo ADF/cofilina¹³⁴. Este complejo se une a la actina filamentosa con el fin de promover la liberación de ADP-actina de las

ramificaciones⁷⁴. La activación de Rac también participa en esta fase, inactivando el complejo ADF/cofilina a través de su efector PAK y de LIMK⁸², impidiendo así el proceso de desensamblaje de los filamentos. El reciclado de las subunidades de actina es el tercer proceso esencial que permite que fluya el ciclo de polimerización, se produce al catalizar el intercambio de ADP por ATP y lo realiza la proteína profilina. En resumen, Rac estimula tanto la formación como la estabilización de nuevos filamentos de actina (Fig. 10).

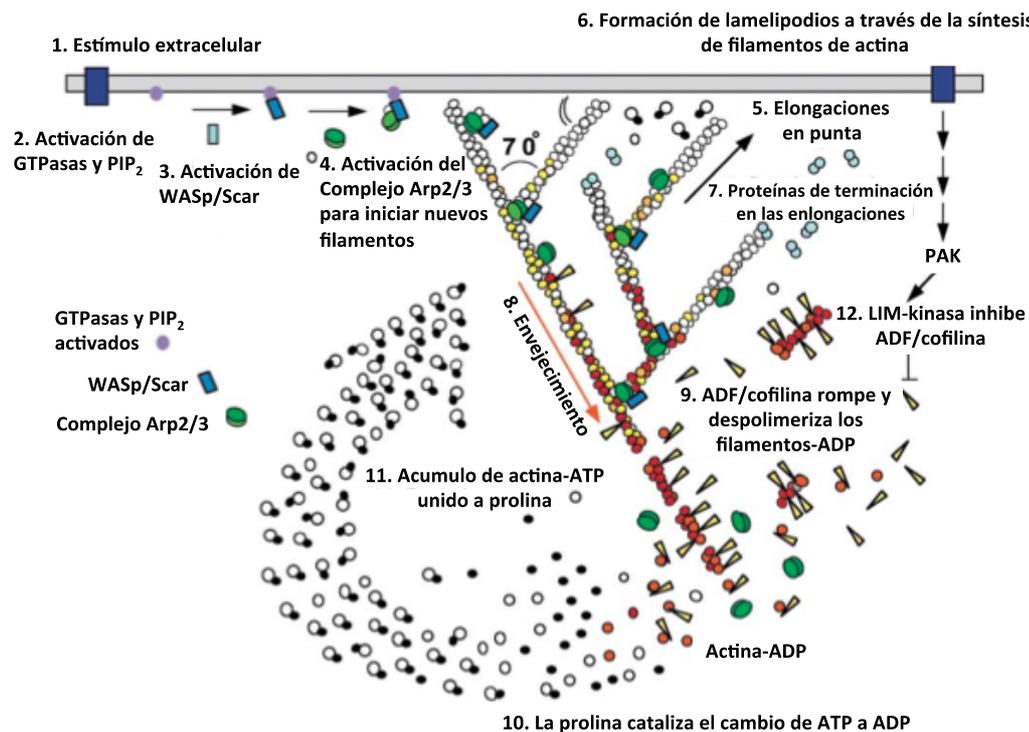


Figura 10. Esquema de la formación de lamelipodios. (1) Los receptores de la membrana son activados por estímulos extracelulares. (2) Se ruta de señalización asociada al estímulo activa las proteínas Rho GTPasa y produce PIP₂ (3) que activa las proteínas Wasp/Scar. (4) Las proteínas Wasp/Scar unen el complejo Arp2/3 con los monómeros de actina en un filamento preexistente para producir las ramificaciones. (5) El rápido crecimiento de los filamentos de actina de las ramificaciones (6) empuje al membrana hacia delante formando los lamelipodios. (7) La elongación para tras unirse las proteínas de terminación. (8) La despolimerización de los filamentos se produce por hidrólisis del ATP unido a cada subunidad de actina (las subunidades antes blancas se representan en amarillas), seguido de la disociación del fosfato (las subunidades se representan en rojo). (9) el complejo ADP/cofilina promueve la disociación del fosfato, rompe los filamentos de actina-ADP y promueve la disociación de la actina-ADP de los extremos del filamento. (10) La proteína profilina cataliza el intercambio de ADP por ATP (11) volviendo a estar listas para subunidades para producir el alargamiento de los filamentos. (12) Las Rho GTPasas también activan PAK y la quinasa LIM, que se encargan de fosforilar el complejo ADF/cofilina, encargado de reducir la velocidad de recambio de los filamentos. (Pollard y Borisy, 2003⁷⁷).

3.2.2 Función de Rac en la adhesión celular

Las vías de señalización reguladas por Rac afectan a la formación y mantenimiento de las uniones intercelulares AJ¹³⁵. Las proteínas fundamentales para la formación de las AJ son las cadherinas clásicas y las cateninas. Las cadherinas son moléculas de adhesión intracelular calcio dependientes, esenciales para el mantenimiento de la arquitectura y morfología celular. Se conocen 20 miembros de la familia de las cadherinas, las cuales se caracterizan por sus patrones de expresión específicos de tipo celular. Dentro de las cadherinas clásicas se encuentran la P-cadherina (placentaria), la N-cadherina (neuronal) y la E-cadherina (epitelial)¹³⁶. En cuanto a su estructura, son proteínas con una zona transmembrana, un dominio extracelular y una cola citoplásmica. Las cadherinas se anclan al citoesqueleto de actina por medio de las proteínas cateninas (α -catenina, β -catenina, γ -catenina/placoglobina y p120 catenina)¹³⁶. Las cateninas serían las proteínas que sirven como nexo entre las moléculas de cadherina y la red de actina, y por extensión, con Rac¹³⁷ (Fig.11).

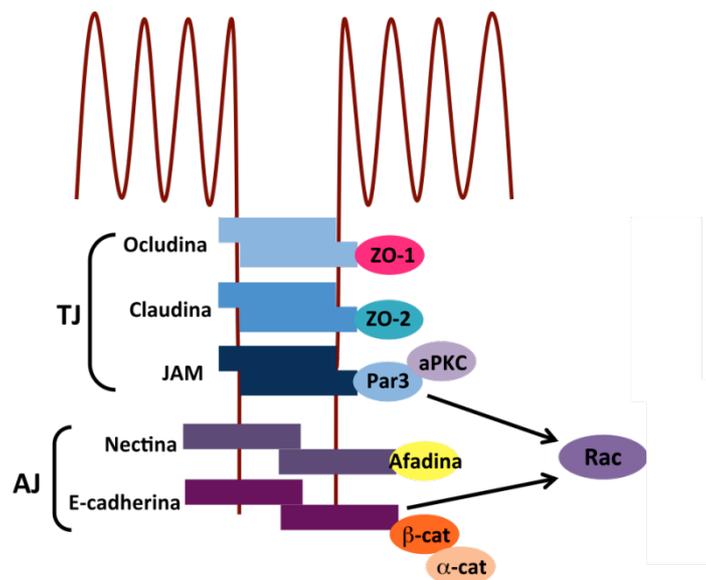


Figura 11. Esquema de las uniones estrechas y las uniones adherentes. (Figura modificada de Malliri et al. 2011⁸⁹)

En células epiteliales, la activación local de Rac es necesaria para el establecimiento de la zona inicial de contacto célula-célula mediada por E-cadherina, proceso que se regula por la acción de Rac sobre el citoesqueleto de actina. Esta acción de Rac también es necesaria para la endocitosis de E-cadherina. E-cadherina, a su vez, puede regular la dinámica de la organización del citoesqueleto y las uniones intercelulares reclutando complejos reguladores como Arp2/3, las forminas y las actininas. Estos datos muestran la estrecha relación entre la formación y mantenimiento de los contactos célula-célula, la regulación de la polimerización y reorganización del citoesqueleto de actina y la

regulación de Rac¹³⁸. Rac también participa en el control tanto de la formación como del mantenimiento de las TJ mediante el control del citoesqueleto de actina y regulando la localización de las proteínas claudina 1 y 2 y JAM.

El otro tipo de uniones generadas en las células, aquellas que conectan las células con el sustrato, son las adhesiones focales. Durante la formación de estas adhesiones, la señalización de Rac puede regular la asociación de MEK1 (MAPKK) y ERK2 así como la activación de esta última, procesos regulados por la activación de PAK por Rac. Este mecanismo específico de regulación del complejo MEK-ERK, a través de la vía Rac-PAK, integra las señales procedentes de la adhesión a ECM y de los factores de crecimiento¹⁰¹.

3.2.3 Función de Rac en la progresión del ciclo celular

Rac está implicado en la regulación tanto de procesos tempranos de la división celular como de procesos físicos tardíos, como es el caso de la citoquinesis.

La progresión de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular está controlada por la ciclina D1. Esta ciclina es uno de los miembros de la familia de ciclinas tipo D que forman complejos con las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y/o CDK6 para favorecer la proliferación¹³⁹. Rac induce la expresión de los genes de la ciclina D1 en la fase temprana de G₁, proceso que requiere la activación en paralelo de NFκB. Esta inducción se combina con la mediada por una activación sostenida de ERK, que induce la expresión de ciclina D1 en la mitad de la fase G₁¹⁴⁰. Esta secuencia de activación de la señalización de la ciclina es célula-dependiente, por lo que Rac puede regular el ciclo celular de forma diferente dependiendo del tipo celular.

Rac también está implicado en la regulación de la progresión de la fase G₂ a la fase M ya que se ha demostrado cómo la acumulación de Rac en el núcleo en la fase G₂ acelera la división celular¹⁴¹.

Por último, Rac también está implicado en la organización del huso mitótico y en el alineamiento de los cromosomas durante la mitosis, así como en la formación del anillo contráctil durante la citoquinesis¹⁴². La correcta regulación de estos procesos es muy importante ya que de ellos depende el mantenimiento de la estabilidad genómica.

3.2.4 Función de Rac en la supervivencia celular

Rac puede influenciar la supervivencia celular modulando la señalización tanto pro como antiapoptótica dependiendo del tipo celular⁵⁴. La señalización a favor de la supervivencia celular promovida por Rac implica la activación de las proteínas de la familia de Bcl2. La proteína PAK media la fosforilación de Bad que bloquea la apoptosis como resultado de la expresión de factores de

supervivencia⁹⁸. Rac también regula la supervivencia celular a través de la activación de Akt, Erk y NF- κ B dependiendo del tipo celular. Algunos ejemplos de su regulación a favor de la supervivencia vía NF- κ B son la inhibición de la apoptosis en fibroblastos o en los acinos mamarios¹³⁵. En el caso de Akt, se ha observado en células no adherentes cómo es necesaria la coordinación con las vías de señalización de Rac¹⁴³.

En contraste, la actividad proapoptótica está ligada a la activación de vías de estrés dependientes de quinasas, entre las que destacan JNK o p38, las cuales se inducen por estímulos como la ionomicina, la radiación UV, la hiperosmolaridad o la exposición a lipopolisacáridos¹³⁰.

3.2.5 Otras funciones de Rac

3.2.5.1 Regulación de actividades enzimáticas

Rac participa en la regulación de diversas actividades enzimáticas entre las que se encuentran enzimas implicadas en el metabolismo lipídico (PI4P 5-kinase, PI3Kinase, DAG kinase, fosfolipasa D y fosfolipasa C) y la enzima NADPH oxidasa¹⁴⁴.

Un componente estructural de la enzima NADPH oxidasa, p67phox, fue uno de los primeros efectores de Rac identificados¹⁴⁵. La unión de Rac a p67phox activa el complejo de la NADPH oxidasa promoviendo la generación de especies reactivas de oxígeno¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Las ROS realizan funciones diferentes dependiendo del tipo celular. Mientras que en células fagocíticas tienen un papel de defensa frente a patógenos, en las células no fagocíticas actúan como mensajeros secundarios de otras vías de señalización¹⁴⁸. El desequilibrio en el balance redox como consecuencia de la generación o acumulación de las ROS, está relacionado con procesos de transformación celular y, en último término, con la tumorigénesis¹⁴⁹.

3.2.5.2 Regulación del transporte de glucosa

Rac se ha relacionado con el transportador de glucosa dependiente de insulina, GLUT4, al participar en la regulación de su translocación a la membrana plasmática¹⁵⁰. Una de los efectos más característicos de la insulina es la estimulación de la entrada de glucosa en las células musculares. Esta actuación se consigue gracias al enriquecimiento del transportador de glucosa GLUT4 en la superficie celular. Recientemente se ha demostrado que la regulación del citoesqueleto de actina mediada por Rac es en parte responsable de la traslocación de GLUT4 a la membrana en las células del músculo¹⁵¹.

3.3 Papel de Rac en el desarrollo y progreso tumoral

Dada la gran diversidad de funciones reguladas por Rac, no es extraño que esta proteína tenga un papel relevante en la biología del cáncer. La actividad de Rac está incrementada en tumores humanos a través de diversos mecanismos que se discutirán más adelante. A continuación se describirá cómo la señalización mediada por Rac puede influir en los distintos estadios de la progresión tumoral, que se muestran en la figura 12.

3.3.1 Papel de Rac en la transformación maligna

Las células cancerosas se caracterizan en la fase inicial del proceso tumoral por la presencia de una serie de alteraciones entre las que se incluyen aquellas asociadas con el control del ciclo celular, la proliferación y la supervivencia.

Una de las habilidades con las que cuentan las células tumorales, en la fase temprana, es la de progresar desde el estado quiescente G_0 a la fase G1 y S en ausencia de señales mitogénicas o de adhesión, lo que les permite proliferar en condiciones anormales. Como ya se ha explicado, Rac controla la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular mediante el control de la expresión de la ciclina D1. La actividad del complejo creado por las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y/o CDK6 y las ciclinas tipo D es fundamental para que la célula entre en el compromiso de proliferar, pues este complejo se encarga de fosforilar e inhibir el supresor tumoral retinoblastoma (Rb) lo que permite al factor de transcripción E2F su actuación y la consecuente entrada en la fase S¹⁵².

Las uniones intercelulares, en concreto las TJ, además de ejercer una función de barrera para el paso de moléculas a través del espacio intercelular, restringen la proliferación celular secuestrando en la membrana proteínas que favorecen la proliferación celular cuando se localizan en el núcleo^{135, 153}. Rac participa en el control tanto de la formación como del mantenimiento de las TJ y por tanto una señalización aberrante de Rac en tumores puede desestabilizar las TJ promoviendo la transformación maligna y el crecimiento tumoral.

Por último, la capacidad de Rac de promover la supervivencia celular puede contribuir a la capacidad de las células tumorales de evadir la apoptosis y favorecer el crecimiento tumoral.

3.3.2 Papel de Rac en invasión y metástasis

Dado que el control de la reorganización del citoesqueleto celular es la función principal de Rac, su papel es esencial en la invasión y metástasis. Un requisito para que una célula tumoral pueda metastatizar es la adquisición de motilidad. Este proceso implica la pérdida de la adhesión intercelular, de la adhesión con la matriz extracelular y proteólisis de la matriz extracelular, todos procesos dependientes de la función de Rac.

Como se mencionó anteriormente, Rac regula el establecimiento y mantenimiento de los contactos intercelulares mediados por E-cadherina (AJ)¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. La pérdida de AJ es una de las características de la transición epitelio-mesénquima, mientras que la ganancia de AJ es característico de la transición mesénquima-epitelio (MET)¹⁵⁸. La actividad de Rac se ha asociado tanto a la formación como a la pérdida de las AJ por lo que es plausible que esté implicado en ambos procesos. La transición epitelio-mesénquima produce un incremento de la motilidad celular y la capacidad invasiva y, por lo tanto, en los casos en los que Rac promueva esta transición favorecería la adquisición de un fenotipo metastásico. Por otro lado, Rac también es importante en el establecimiento de AJ. En estos casos, Rac participaría en la transición MET de las células metastásicas, facilitando la formación secundaria de tumores en los sitios de metástasis.

Rac también puede controlar la migración celular mediante su capacidad de regular la formación de lamelipodios en el frente de avance de las células, estructuras que son importantes para dirigir el desplazamiento de las células. Para este desplazamiento también es necesario el continuo ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones, proceso en el que también participa Rac¹⁵⁹.

Por último, existen evidencias que implican a Rac en la expresión alterada de metaloproteinasas (MMPs), enzimas a través de las cuales se modula la degradación de la matriz extracelular durante el proceso de invasión^{160, 161}.

3.3.3 Papel de Rac en la angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Este mecanismo es necesario para el crecimiento del tumor y la metástasis, pues suplementa oxígeno y nutrientes a la masa tumoral. La señalización mediada por Rac participa en la regulación de la angiogénesis a través del control en la motilidad y la morfología de las células endoteliales procesos necesarios para que las células endoteliales formen nuevos capilares^{162,163}. Además Rac participa en la regulación de la permeabilidad endotelial inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o la trombina, acelerando así la extravasación de las células tumorales y la metástasis¹⁶⁴.

Otra vía por la cual Rac puede modular las funciones mediadas por VEGF es a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa, la cual desencadena la producción de ROS necesarios para iniciar la señalización de las vías activadas por VEGF importantes para la angiogénesis. Dado que las NADPH oxidasas reguladas por Rac son la mayor fuente de generación de ROS en las células vasculares, el papel de Rac en la angiogénesis es crucial¹⁴⁸. Además de ser activado tras la estimulación de VEGF, Rac también puede inducir la expresión de VEGF y otros factores angiogénicos entre los que se incluyen la óxido nítrico sintasa (NOS), PDGFβ y angiopoyetina-2. Ésta regulación se encuentra mediada por la expresión del factor inducible por hipoxia HIF-1^{165, 166}.

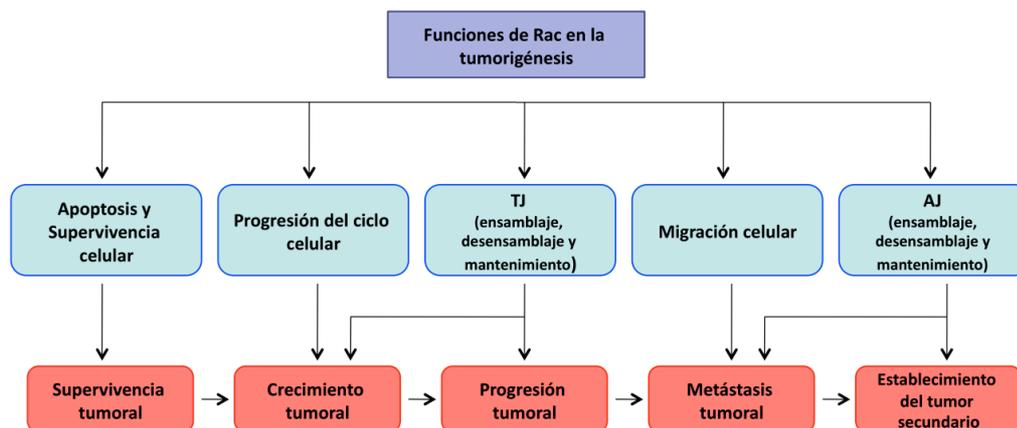


Figura 12. Esquema de las funciones reguladas por Rac en cáncer de mama. (Figura modificada de *Malliri et al, 2011*⁸⁹)

3.4 Alteraciones de la actividad de Rac en cáncer de mama

Existen varios mecanismos responsables de la alteración de Rac en las células cancerígenas, que abarcan desde el aumento de la expresión de la proteína en sí hasta mutaciones, pasando por cambios en los reguladores y efectores que se encuentran en las vías de señalización por debajo de Rac. A continuación se describirán los cambios más frecuentemente encontrados en cáncer de mama.

3.4.1 Alteraciones de Rac

A pesar de las numerosas evidencias que demuestran que la activación de Rac promueve procesos biológicos ventajosos para el desarrollo y la progresión del cáncer, las mutaciones activadoras de Rac son muy poco frecuentes en tumores¹⁶⁷. En las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-157 y HCC1143 se han encontrado mutaciones activadoras en Rac1 (mutación P29S) y en Rac2 (mutación P29L)¹⁶⁷. Sin embargo, no se han descrito estas mutaciones en tumores de mama humanos aunque la mutación de Rac1 se ha encontrado en el 5% de melanomas¹⁶⁸.

En cáncer de mama es frecuente la sobreexpresión de Rac1, Rac3^{112, 169} y de la isoforma Rac1b, que también se sobreexpresa en otros tipos de cáncer como el de colon, ovario y testículo¹⁷⁰. La isoforma Rac1b se trata de una variante de Rac1 generada por *splicing* alternativo que contiene una inserción de 19 aminoácidos¹⁷¹. El cambio fundamental que presenta esta isoforma es bioquímico, pues la inserción dota a Rac1b de una capacidad de intercambiar GDP por GTP drásticamente aumentada¹⁷². Además, cuando se analizó su capacidad intrínseca de hidrolizar GTP se vio que ésta estaba reducida. Otra de las peculiaridades de Rac1b es su incapacidad para unirse al GDI¹⁷³. La pérdida de la regulación por GDIs mantiene a Rac1b de forma constitutiva unido a la

membrana. Las proteínas GAPs y GEFs, sin embargo, sí pueden regular Rac1b. No obstante, dado que la capacidad de Rac1b de retornar al estado activo es prácticamente inmediata, se puede decir que la actuación de los GEFs y los GAPs en esta isoforma resulta ser redundante¹⁷². El estado predominantemente activo de Rac1b produce una activación constante de las vías de señalización que controla. Las funciones reguladas por Rac1b son diferentes a las de Rac debido a su incapacidad para unirse a algunos efectores como PAK, JNK o NF- κ B. Además no está implicada en la formación de lamelipodios¹⁷⁴. Por el contrario, esta variante de *splicing* interacciona de forma similar a Rac1 con proteínas como Akt¹⁷⁵. Otros ejemplos de efectores a los se une de forma muy favorable son SmgGS (RacGEF), RACK1 (receptor de la quinasa activada C1) y p120-catenina, proteína que como se mencionó en apartados previos, es muy importante en la adhesión celular, motilidad y regulación de la transcripción¹⁷¹. Además, en cáncer de mama Rac1b forma un complejo con la enzima NADPH oxidase induciendo la producción ROS, la expresión de Snail y la activación del proceso de transición epitelio-mesénquima¹⁷⁶.

La activación anómala de Rac encontrada en tumores de mama también puede deberse a diferencias en la expresión de RacGEFs y RacGAPs que se explicarán más detalladamente en el siguiente apartado.

3.4.2 Alteraciones de RacGEFs y RacGAPs

Rac no solo está sobreexpresado en cáncer de mama, también se ha descrito la hiperactivación de esta proteína en este tipo de tumores. Además, en pacientes con cáncer de mama recurrente se ha observado un incremento en la localización en membrana de Rac, lo que sugiere que la activación de esta GTPasa está asociada con una mayor agresividad del cáncer de mama¹¹². Como ya se ha explicado con anterioridad, no se conocen mutaciones oncogénicas de Rac en tumores de mama, por lo que el aumento de su actividad puede ser debido a alteraciones en sus proteínas reguladoras, bien a una mayor actividad de los GEFs o a una menor actividad de los GAPs¹³⁵.

Existen múltiples estudios que correlacionan la activación de Rac en cáncer de mama con la hiperactivación de RacGEFs¹³⁰. Por ejemplo, P-Rex1, regulador de la actividad de Rac y de la motilidad de células de cáncer de mama en respuesta a la estimulación de los receptores ErbB, está sobreexpresado en tumores de mama humanos¹²⁰. La expresión del GEF Tiam1 se ha correlacionado con carcinomas de mama de alto grado¹⁷⁷. Trio también está sobreexpresado en tumores de mama y se considera un marcador de tumores con mala prognosis¹⁷⁸. Por último Vav3, que en células de cáncer de mama activa la transcripción del receptor ER α , está sobreexpresado en el 81% de los tumores de mama humanos¹⁷⁹.

A diferencia de los GEFs, existen muy pocos GAPs cuya inhibición se haya asociado con el cáncer de mama. Se ha descrito recientemente que la expresión

de srGAP3 esta marcadamente reducida en numerosas líneas celulares de cáncer de mama en comparación con células de mama no tumorales¹⁸⁰. De manera similar, la expresión de β 2-quimerina esta reducida en tumores de mama y en líneas celulares de cáncer de mama, relacionándose esta disminución de la expresión con una mayor proliferación celular¹⁸¹. Teniendo en cuenta la relevancia de β 2-quimerina en este estudio, en el siguiente apartado se profundizará en la familia de las quimerinas y en especial en la relación de la isoforma β 2 con los procesos tumorales y con el cáncer de mama.

4. Quimerinas

4.1 Genes de las quimerinas

Las quimerinas son proteínas GAPs específicas de la GTPasa Rac. Se conocen hasta el momento cinco miembros de la familia de las quimerinas: α 1-, α 2-, β 1-, β 2- y β 3-quimerina¹⁸²⁻¹⁸³ (Fig. 13). Las isoformas α 1- y α 2-quimerina se originan por transcripción alternativa del gen *CHN1*, localizado en el cromosoma 2q31.1 en humanos, mientras que las isoformas β 1-, β 2- y β 3-quimerina son transcritos alternativos del gen *CHN2*, situado en humanos en el cromosoma 7p15.3^{184, 185}.

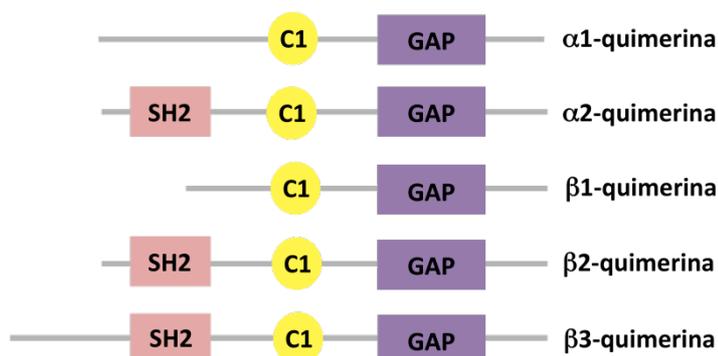


Figura 13. Estructura de los miembros de la familia de las quimerinas. Las isoformas α 1- y α 2-quimerina se originan a partir de la transcripción alternativa del gen *CHN1*, mientras que las isoformas β 1-, β 2- y β 3-quimerina son transcritos alternativos del gen *CHN2*. Los dominios C1 y GAP están presentes en todas las isoformas a diferencia del dominio SH2, únicamente presente en las isoformas α 2, β 2 y β 3-quimerina.

El patrón de expresión de las isoformas de las quimerinas es muy diferente. Mientras que las isoformas α 1- y β 1-quimerina se expresan mayoritariamente en cerebro y testículo respectivamente, las isoformas α 2- y β 2-quimerina se han detectado en una amplia variedad de tejidos y líneas celulares, especialmente esta última¹⁸². El perfil de expresión de la isoforma β 3 revela bajos niveles de transcripto excepto en epidídimo, leucocitos, bazo, timo y algunas áreas del cerebro¹⁸⁶. Debido al reciente descubrimiento de la β 3-quimerina y la escasa

información que se tiene a día de hoy no se va a entrar en más detalles sobre ella.

4.2 Estructura y propiedades bioquímicas

Todas las isoformas de las quimerinas tienen un dominio GAP C-terminal que les permite regular la activación de Rac y un dominio C1, esencial para regular su localización subcelular. Además, las isoformas $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\beta 3$ poseen un dominio SH2 en el extremo N-terminal¹⁸⁵ (Figs. 13 y 14).

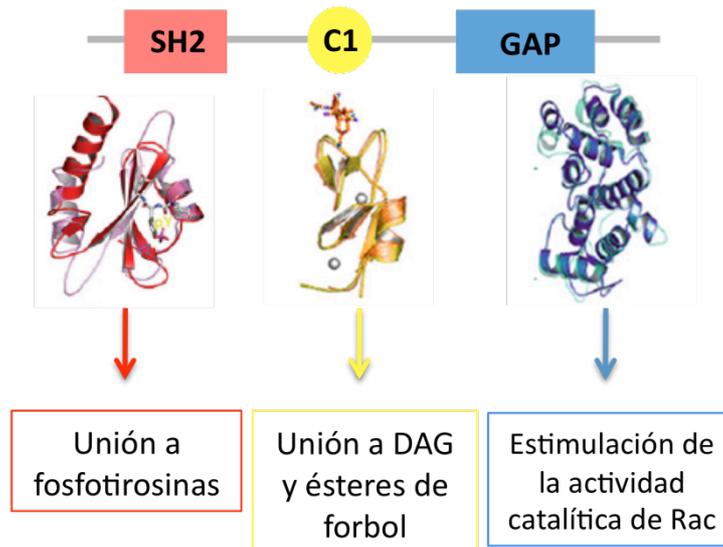


Figura 14. Estructuras tridimensionales de los dominios funcionales de las quimerinas. El dominio SH2 se localiza en el extremo amino-terminal de las isoformas $\alpha 2$ - y $\beta 2$ -quimerina y posee una zona consenso de unión a fosfotirosinas. El dominio C1 permite la unión a DAG y ésteres de forbol necesaria para la regulación de la actividad de las quimerinas. El dominio GAP se localiza en el extremo carboxi-terminal y estimula la actividad GTPasa intrínseca de Rac.

4.2.1 Dominio C1

El dominio C1 es globular, con un tamaño de alrededor de 50 aminoácidos, tiene un 40% de homología con el de las proteínas quinasas C (PKCs) y posee los requerimientos estructurales necesarios para la unión a DAG y ésteres de forbol, incluyendo el motivo $HX_{12}CX_2CX_{13/14}CX_2CX_4HX_2CX_7C$ característico de los dominios C1 típicos.

La presencia de un dominio C1 en una proteína no es condición suficiente para que se produzca la unión a DAG y ésteres de forbol con alta afinidad, pues sólo un subgrupo de proteínas, dentro de las proteínas que poseen dominios C1, es capaz de ello. En el caso de las PKCs, solamente las isoformas que presentan dos dominios C1 en tandem, las denominadas clásicas (PKC α , βI , βII y γ) y las

noveles, (PKC δ , ϵ , η y θ), son capaces de unir DAG. En cambio, las isoformas denominadas atípicas (PKC ζ y PKC λ/ι), con un único dominio C1, no responden a DAG y ésteres de forbol. La primera proteína con un solo dominio C1 en ser descrita como una proteína de unión a DAG y ésteres de forbol fue α 1-quimerina^{187, 188}. Posteriormente se comprobó que el resto de las isoformas de las quimerinas, así como como las proteínas PKD (proteína quinasa D), RasGRP 1, 2 y 4 (*Ras guanine releasing-protein*), Munc-13 y las isoformas β y γ de DGK (DAG quinasas) también eran capaces de unir DAG^{189, 190}. Estas proteínas constituyen los denominados nuevos receptores para DAG.

Los dominios C1 de las isoformas α 1- y α 2-quimerina son idénticos, al igual que sucede entre las isoformas β 1-, β 2- y β 3-quimerina. Además, los dominios C1 de las α y β -quimerinas presentan una homología del 94%¹⁹¹. La caracterización de las quimerinas como receptores de DAG y ésteres de forbol ha sido ampliamente detallada. Se ha demostrado que el dominio C1 de las quimerinas une estos compuestos con alta afinidad y que esta unión es dependiente de la presencia de fosfolípidos ácidos^{182, 183}. Además, la unión de DAG y ésteres de forbol induce la traslocación de las quimerinas desde el citosol a las membranas, mecanismo esencial de la regulación de estas proteínas. Estudios de mutagénesis demostraron que el dominio C1 es esencial para esta regulación ya que una mutación puntual en la cisteína 246 de β 2-quimerina, que afecta a la estructura total del dominio C1, impide la capacidad de la proteína de relocalizarse en respuesta al ester de forbol PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) u otros ésteres de forbol análogos¹⁹². En conjunto, estos datos implican que las quimerinas actúan como receptores del DAG generado en respuesta a la activación de receptores.

4.2.2 Dominio GAP

El dominio GAP se sitúa en el extremo C-terminal de las quimerinas y es el encargado de acelerar la capacidad GTPasa intrínseca de Rac^{121,192}. Está compuesto por alrededor de 150 aminoácido que presentan alta homología con el dominio GAP de la proteína BCR¹⁸². El dominio GAP de las isoformas α 1- y α 2-quimerina son idénticos, al igual que sucede entre las isoformas β 1-, β 2- y β 3-quimerina y entre las isoformas α - y β -quimerinas comparte el 77% de identidad¹⁸⁴.

Experimentos *in vitro* han demostrado que las quimerinas aumentan la hidrólisis de Rac1, pero no la de Cdc42 ni RhoA¹²¹. Esta especificidad se explica por los datos derivados de la estructura cristalina de β 2-quimerina, que muestra unas interacciones estéricas y electrostáticas desfavorables para la unión con Cdc42 y RhoA, de forma que se impide la actividad catalítica sobre estas GTPasas. Además, el residuo de arginina en posición 311 de β 2-quimerina es el denominado “dedo de arginina” característico de los dominios GAP, que interactúan con el sitio activo de las GTPasas, estabilizando así el estado de transición para la hidrólisis del GTP¹⁹³.

La actividad GAP de las quimerinas es sensible al entorno lipídico. Estudios realizados en α 1-quimerina revelaron que la actividad RacGAP se estimulaba significativamente por la presencia de fosfatidilserina (PS) y ácido fosfatídico (PA), y que los ésteres de forbol podían actuar en sinergia con estos lípidos¹⁹⁴. Además, el ácido lisofosfatídico (LPA), los lípidos derivados de fosfatidilinositol (PtdIns, PtdInsP y PtdInsP₂) y el ácido araquidónico inhiben la actividad RacGAP de esta isoforma¹⁹⁴.

4.2.3 Dominio SH2

Las isoformas α 2, β 2 y β 3-quimerina tienen en su extremo N-terminal un dominio SH2, el cual guarda el 82% de homología entre ellas¹⁹⁵. Una de las singularidades de este dominio en las quimerinas es la presencia de un residuo de ácido glutámico al comienzo de su secuencia en vez de triptófano, aminoácido común en otros dominios SH2¹⁹⁵. Sin embargo, las secuencias consenso de unión a fosfotirosinas se encuentran preservados.

Se sabe muy poco sobre la función del dominio SH2 de las quimerinas. Estudios previos han demostrado que en la isoforma α 2-quimerina el dominio SH2 interactúa con proteínas esenciales para la diferenciación neuronal¹⁹⁶, ya que la expresión en células PC12 de α 2-quimerina con una mutación en dicho dominio, produce un fenotipo similar al de la isoforma α 1-quimerina^{191, 192}. Otros estudios han descrito un mecanismo por el que podría regularse negativamente β 2-quimerina a través de la fosforilación de un residuo de tirosina situado en el dominio SH2¹⁹⁷, sobre lo que se profundizará más adelante.

4.3 Estructura tridimensional y modelo de regulación

La resolución de la estructura cristalina de la isoforma β 2-quimerina fue un factor determinante para el entendimiento de la regulación de estas proteínas¹⁹³. Los datos obtenidos del análisis cristalográfico revelaron que el dominio C1 forma amplios contactos hidrofóbicos con el dominio GAP y el dominio SH2. La zona amino terminal se inserta en el dominio GAP bloqueando su sitio activo y la unión a Rac. Además, el dominio C1 se encuentra oculto por el plegamiento y los contactos con los dominios. Esta estructura tridimensional de β 2-quimerina explicaría el requerimiento de concentraciones mucho más elevadas de ésteres de forbol para inducir la translocación de β 2-quimerina en relación a las que se requieren para la translocación de las PKCs pese a la similitud de sus dominios C1^{192, 198}.

Basados en estos estudios se ha propuesto un modelo de activación para las quimerinas, según el cual en condiciones basales las quimerinas se encuentran en una conformación auto-inhibida en el citoplasma. Tras la estimulación de receptores que resultan en la generación de DAG, se produce un cambio conformacional que expone el dominio C1 permitiendo la unión al DAG y

la inserción en la membrana donde se asocia con RacGTP y cataliza su conversión de RacGTP a RacGDP¹⁹³ (Fig. 15).

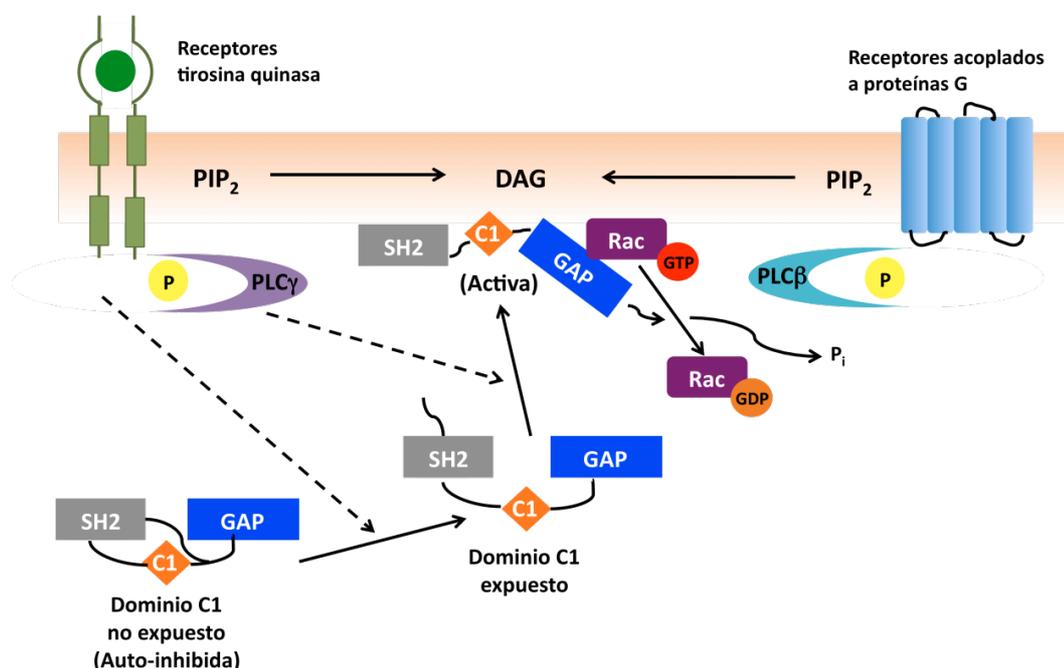


Figura 15. Modelo de regulación de Rac a través de la β2-quimerina. Las quimerinas se encuentran en el citoplasma en estado inactivo. Tras la estimulación de receptores que regulan la generación de DAG, se produce un cambio conformacional que expone el dominio C1. La proteína desplegada se trasloca a la membrana plasmática, donde se une al DAG, se activa y ejerce su función GAP sobre la proteína Rac. (Figura modificada de Colón-González y Kazanietz, 2006¹⁹⁹)

Aunque este modelo explica cómo se activan las quimerinas, no desvela cómo ocurren los cambios conformacionales que exponen el dominio C1. Se ha propuesto que modificaciones postraduccionales, probablemente fosforilación, o interacciones con otras proteínas, son necesarias para la transición a una conformación abierta. No obstante, aunque se ha descrito la fosforilación de β2-quimerina en varios residuos, todas las fosforilaciones son inhibitorias. La fosforilación en Ser169 impide la traslocación de β2-quimerina a la membrana²⁰⁰. Asimismo, las fosforilaciones en Tyr21 y Tyr153 por las SFK (*Src family kinase*), regulan negativamente la traslocación de β2-quimerina y su actividad Rac-GAP¹⁹⁷. Un dato relevante es que c-Scr se ha relacionado con el desarrollo, crecimiento, progresión y metástasis de varios tipos de cáncer incluido el de mama²⁰¹. Esta función es en parte mediada por la activación de Rac por c-Scr a través de la activación de GEF y de la inhibición de los GAPs²⁰². Por último, en células T, la fosforilación de β2-quimerina por la tirosina quinasa Lck desestabiliza su unión a la membrana, es decir, inhibe su actividad GAP. En conjunto, estos mecanismos de regulación de la actividad de β2-quimerina permiten restringir la actuación de esta proteína. La regulación espacio/temporal

de las quimerinas como ya se ha mencionado es importante en los procesos regulados por Rac, como por ejemplo la migración direccional^{203, 204}.

4.4 Rutas de señalización reguladas por las quimerinas

4.4.1 Quimerinas como efectores de receptores tirosina quinasa y GPCR

Varios estudios indican que β 2-quimerina es un efector del receptor tirosina quinasa EGFR. La estimulación del receptor con EGF induce la translocación de β 2-quimerina a la membrana para regular la activación de Rac¹²². La eliminación de β 2-quimerina con un RNAi aumenta significativamente la duración de la activación de Rac1 por EGF, sugiriendo que β 2-quimerina sirve como un mecanismo para limitar la actividad de Rac en respuesta a la activación de EGFR.

Otros de los receptores tirosina quinasa implicados en la activación de las quimerinas son los receptores de efrinas EphA2 y EphA4. Las isoformas α 1- y α 2-quimerina se unen al dominio quinasa de EphA4, con la salvedad de que α 2-quimerina necesita que el receptor esté activado para la unión²⁰⁵. En el caso de la activación de β 2-quimerina, se ha demostrado que es capaz de unirse tanto al receptor EphA4 como EphA2²⁰⁶. Se ha demostrado que la activación de las quimerinas por estimulación de los receptores EphA media la inhibición de la migración²⁰⁷, especialmente en la organización de los tejidos durante los procesos de desarrollo²⁰⁶.

Los GPCR pueden activar PLC β generando así DAG a través de la vía de las proteínas heterotriméricas Gq y activando las quimerinas. Como ejemplo de ligando implicado en esta ruta de activación se encuentra el factor CXCL12 (conocido como factor derivado del estroma 1 α o SDF-1 α)²⁰⁸, una quimioquina que se une a los receptores presentes en los progenitores de las células B y en las células Jurkat capaz de modular la actividad de las quimerinas²⁰⁴. En células Jurkat se ha comprobado que CXCL12 promueve la traslocación de β 2-quimerina de manera dependiente de DAG.

Este papel como regulador de la localización de las quimerinas vía DAG también se ha descrito para el receptor muscarínico de acetilcolina mAChR1, un receptor acoplado a Gq-PLC β cuya estimulación se ha relacionado con la activación de α 1-quimerina²⁰⁹.

4.4.2 Interacción con otras proteínas

Diversos estudios han identificado proteínas que interaccionan con las quimerinas, sugiriendo la posibilidad de que estas proteínas participen en complejos multiproteicos.

La proteína de transmembrana Tmp21-I (p23), localizada en la red *cis-Golgi*, fue identificada como proteína de unión a β 2-quimerina en un ensayo de dos híbridos. La interacción de ambas proteínas se produce tras la estimulación celular y es dependiente del dominio C1²¹⁰. Se ha sugerido que las quimerinas podrían estar relacionadas con los mecanismos de transporte intracelular, dada la implicación de Tmp21-I en el tráfico vesicular intracelular²¹⁰.

Se han identificado varias interacciones entre las quimerinas y proteínas implicadas en procesos neuronales. Por ejemplo, α 1- y α 2-quimerinas interactúan con p35, formando a su vez un complejo con la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) y se ha propuesto que esta asociación es necesaria para coordinar el remodelamiento de los filamentos de actina de las neuronas²¹¹. También se ha demostrado que α 2-quimerina interactúa con CRMP-2 (*collapsin-response mediator protein-2*) a través de su dominio SH2²¹¹. Además, en dendritas y espinas neuronales, α 1-quimerina se une con la subunidad NR2A del receptor NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*), unión regulada por los ésteres de forbol²¹².

Las funciones reguladas por las quimerinas también están influenciadas por su asociación con los adaptadores Nck1 y Nck2²¹³ que regulan la señalización de los receptores tirosina quinasa para controlar la organización del citoesqueleto de actina²¹⁴. Se ha identificado una zona rica en prolina en las quimerinas α 2 y β 2 que es capaz de unirse al tercer dominio SH3 de la proteína Nck1 en respuesta a la estimulación del EGFR²¹³.

4.5 Funciones biológicas de los miembros de la familia de las quimerinas

Las funciones biológicas de las quimerinas descritas hasta el momento están asociadas a su actividad como reguladores negativos de Rac y por tanto participan en las funciones controladas por esta GTPasa en varios sistemas celulares.

4.5.1 Funciones de las quimerinas en el sistema nervioso

Una de las funciones principales de las quimerinas es la regulación de la dinámica del citoesqueleto en el sistema nervioso²¹⁵. α 2-quimerina regula la dinámica del citoesqueleto de neuronas, y es importante en la guía del cono de crecimiento neuronal²¹⁶, funciones mediadas, como ya se ha comentado, por la asociación de la proteínas p35 y Cdk5 y sus dominios GAP y SH2²¹¹. α 1-quimerina es capaz de limitar la expansión de las protrusiones dendríticas mediante la inactivación de Rac1 y contribuye de esta forma al desarrollo normal de las arborizaciones dendríticas²⁰⁹, mientras que la actuación de α 2-quimerina no solo no bloquea el proceso de ramificación de las dendritas, sino que favorece su extensión¹⁹⁶.

Recientemente se ha descrito que la activación de β 2-quimerina es necesaria para el desarrollo de la estructura del tracto infrapiramidal del hipocampo, implicada en la memoria espacial y en el aprendizaje. En este proceso β 2-quimerina regula el proceso de 'poda' de los axones así como la eliminación de las sinapsis mediante la regulación de Rac a través de β 2-quimerina^{217, 218}.

4.5.2 Funciones de las quimerinas en el sistema inmune

Las primeras evidencias de la expresión endógena de las quimerinas en células T, sugirieron un papel de estas proteínas en el sistema inmune²¹⁹. Las quimerinas contribuyen a la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina durante la adhesión y migración de los linfocitos T tras la estimulación por factores quimiotácticos como CXCL12^{208, 219}. También se ha descrito la localización de β 2-quimerina en la sinapsis inmunológica, lo que sugiere una función de esta proteína en la formación y/o función de esta estructura²²⁰. La sinapsis inmunológica, por la cual las células presentadoras de antígeno (APC) exponen el antígeno a los receptores de células T (TCR), requiere la reorganización de proteínas en las zonas de contacto (APC/TCR) para llevar a cabo la señalización. La correcta distribución de las proteínas durante la sinapsis es crítica para obtener una respuesta de las células T eficiente, y está muy regulada por la polimerización de actina como resultado de la regulación de Rac²²¹.

4.5.3 Funciones de las quimerinas en el desarrollo

La función de las quimerinas durante el desarrollo embrionario se ha observado eliminando la expresión del gen homólogo a *CNH1* en el pez cebra²²². En este modelo se observaron cambios morfogénicos en el embrión que se producen, fundamentalmente, en la distribución celular a lo largo del eje anteroposterior, lo que apoya la influencia de la actividad Rac en la regulación de los movimientos morfogénicos durante la fase de gastrulación²²².

Por otro lado, el gen ortólogo al de las quimerinas en *Drosophila melanogaster*, RhoGAP5A, desempeña un papel fundamental durante el desarrollo del ojo²²³. La reducción de RhoGAP5A tiene como consecuencia el incremento de los niveles de ERK activo en la membrana plasmática, lo que se asocia con un número aberrante de adhesiones intercelulares¹⁰¹. Cambios en la actividad de Rac también provocan daños en los contactos célula-célula y este fenotipo se muestra exacerbado cuando se reducen los niveles de RhoGAP5A.

4.6 Enfermedades asociadas con las alteraciones de las quimerinas

Dado el papel relevante que tienen las quimerinas en el sistema nervioso, la patología que hasta el momento se ha asociado más claramente con un funcionamiento anómalo de estas proteínas es el síndrome de retracción de

Duane, afección congénita autosómica dominante del movimiento ocular debida a una inervación anómala de los músculos extraoculares causada por mutaciones en el gen *CHN1*²²⁴. También se describió una traslocación cromosómica en un estudio de diabetes familiar que implica el gen *CHN2*, sugiriendo la implicación de β 2-quimerina en esta patología²²⁵.

Por último, existen evidencias que sugieren que las quimerinas desempeñan un papel importante en la transformación maligna. La primera asociación de las quimerinas con el cáncer se describió en un estudio realizado para identificar genes con expresión diferencial en glioblastomas. En este estudio se descubrió que los niveles de expresión de la β 2-quimerina en los gliomas de alto grado son muy bajos en relación con los niveles de expresión en cerebro sano o los astrocitomas de bajo grado, sugiriendo que la inactivación de esta proteína se asocia con la progresión tumoral²²⁶. También en cáncer de mama es frecuente la disminución de la expresión de β 2-quimerina, lo que apoya el papel como supresor de tumores de esta proteína en este tipo de cáncer. En el apartado siguiente se profundizará en las evidencias que apoyan esta función.

4.6.1 β 2-quimerina y cáncer de mama

Son múltiples los vínculos que unen la proteína β 2-quimerina con el cáncer de mama. En primer lugar, los niveles del mRNA de β 2-quimerina están significativamente reducidos tanto en líneas celulares de cáncer de mama como en tumores de mama en comparación con el tejido y células normales¹⁷⁴. Además, un estudio computacional masivo realizado con tumores de pacientes de cáncer de mama, con la finalidad de crear una herramienta online capaz de favorecer la prognosis de la enfermedad, analizó los niveles de expresión de 22,277 genes, entre los que se encontraba el gen *CHN2* que codifica para β 2-quimerina. El estudio de los niveles de β 2-quimerina (mediante la plataforma *Affymetrix*) mostró, mediante el análisis de la curva de supervivencia de estos pacientes (*Kaplan-Meier*), una mayor susceptibilidad a desarrollar la patología en aquellos pacientes con niveles menores de β 2-quimerina. Estos datos sugirieron un papel para esta isoforma de las quimerinas en la progresión tumoral²²⁷ (Fig. 16). Apoyando esta hipótesis, la transfección del dominio GAP de β 2-quimerina en células de carcinoma de mama de ratón, F3II, disminuye la de proliferación y el potencial de invasión de las células que la expresaban^{206, 228}. Además, otro estudio realizado en la línea celular de cáncer de mama MCF7 demuestra que la expresión ectópica de β 2-quimerina es suficiente para bloquear el ciclo celular entre las fases G₁ y S e inhibir la proliferación^{181, 185, 229}. Este estudio reveló en paralelo unos niveles decrecientes de expresión de la ciclina D1 y pRb, moléculas directamente relacionadas con la proliferación celular^{181, 229}. Finalmente, otra de las rutas afectadas por los cambios en la actividad de β 2-quimerina es la de las MAPK. En ausencia de β 2-quimerina, los niveles de ERK activado aumentan así como su localización en la zona de contactos intercelulares de la membrana, donde se establecen las AJ, que en este contexto se encuentran desorganizadas y dañadas²³⁰.

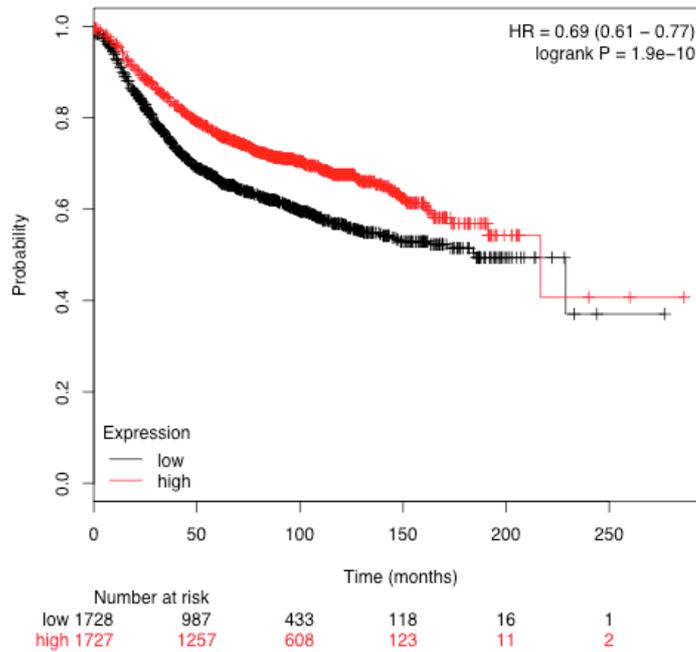


Figura 16. Curva de supervivencia representativa del estudio computacional de β 2-quimerina en pacientes de cáncer de mama. En la figura se muestran las curvas Kaplan-Meier correspondientes a la supervivencia de los pacientes de cáncer de mama en función de la expresión de β 2-quimerina presentes en las muestras tumorales. Los pacientes con altos niveles de β 2-quimerina se muestran en rojo y con bajos en negro. Kaplan-Meier Plotter Web : <http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>

Los estudios resumidos en este apartado sugieren que la inactivación de β 2-quimerina en tumores no es un hecho meramente circunstancial, sino que esta proteína es una de las moléculas clave implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer de mama.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La GTPasa Rac, sustrato de β 2-quimerina, es un regulador clave en la señalización celular que juega un papel esencial en el control de numerosas funciones celulares que están alteradas en procesos tumorales. De hecho, un incremento anómalo de su activación está asociado con la progresión tumoral y con la aparición de fenotipos más invasivos en varios tipos de cánceres, incluido el de mama. Entre los mecanismos moleculares que desencadenan la activación de Rac en tumores se encuentra la inhibición de las proteínas reguladoras GAPs. En cáncer de mama se ha descrito la inhibición de la expresión de β 2-quimerina, proteína GAP específica de Rac, sugiriendo una función de esta proteína como supresora de tumores en esta patología.

A pesar de que existen estudios en modelos celulares que relacionan estas proteínas con los procesos implicados en la transformación maligna, su papel como mediador en el proceso de oncogénesis *in vivo* no ha sido estudiado en profundidad. Nuestra hipótesis es que la eliminación de β 2-quimerina en modelos genéticos de cáncer de mama favorecerá el desarrollo de tumores y, por el contrario, la restauración de su actividad en células de cáncer de mama revertirá el fenotipo tumoral. Para evaluar esta hipótesis y determinar el papel que β 2-quimerina en cáncer de mama nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar en modelos animales la función de β 2-quimerina como supresor de tumores en cáncer de mama.
2. Estudiar los mecanismos moleculares regulados por β 2-quimerina implicados en cáncer de mama.
3. Evaluar la función de β 2-quimerina en los procesos de transición epitelio-mesénquima a través de la regulación del citoesqueleto de actina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos murinos

Todas las líneas de ratones utilizadas en este estudio fueron estabuladas en condiciones apropiadas en el animalario del Centro de Investigaciones del Cáncer (Salamanca) y en el de la Universidad de Valladolid. Todos los experimentos descritos, en los que se utilizaron animales, se realizaron de acuerdo a la legislación Española (RD 53/2013) y a la legislación de la Unión Europea sobre protección de animales de experimentación (Directiva 2010/63/UE). Los métodos experimentales fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca, minimizando en todo momento el número de animales utilizados y su sufrimiento.

1.1 Ratones Knockout para β 2-quimerina (ratones *chn2*^{-/-})

Los ratones knockout (KO) para β 2-quimerina se generaron por la compañía Léxicon Genetics (Lexicon Pharmaceuticals, Inc, TX, USA), utilizando la tecnología basada en la mutagénesis por inserción retroviral (“gene-trap”). Mediante la búsqueda en la base de datos de esta compañía se identificó un clon de células ES (Embrionic Stem) que contenía una inserción “trap” en el gen *chn2*, que codifica las isoformas β -quimerinas. La posterior secuenciación de este clon por PCR genómica inversa, realizada por la compañía, confirmó que el “gene trap” retroviral se había insertado en el intrón 1 del gen “downstream” del exón que codifica para la metionina inicial. Una vez identificado el clon adecuado los ratones heterocigotos se generaron por métodos normales (inyección en blastocistos de hospedador, producción de quimeras y transmisión de la línea germinal).

1.2 Ratones ErbB2/Neu

Como modelo para el estudio del cáncer de mama se utilizó el ratón portador del transgén *MMTV-ErbB2/Neu*, cepa 202 en fondo genético FVB, generado por Muller y *col*²³¹. Estos ratones están disponibles en los laboratorios Jackson y fueron amablemente cedidos por el Dr. Pérez Losada (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca). Estos animales son susceptibles de desarrollar cáncer de mama debido a la sobreexpresión del protooncogén ErbB2/Neu de rata bajo el promotor constituido por la región LTR (*Long Terminal Repeat*) del MMTV (*Mammary Mouse Tumor Virus*).

1.3 Generación de ratones MMTV-ErbB2/Neu deficientes en β 2-quimerina

La línea mixta de ratones MMTV-ErbB2/Neu deficientes en β 2-quimerina se generó mediante el cruce de ratones *chn2*^{-/-}, en fondo C57Bl6, con los animales transgénicos MMTV-ErbB2/Neu, en el fondo FVB. Los animales heterocigotos para ambos genes se retrocruzaron durante 5 generaciones con ratones FVB para homogeneizar el fondo genético. Se seleccionaron entonces animales

heterocigotos para el gen *chn2* y homocigotos para el gen *ErbB2/Neu*, que se cruzaron entre sí para generar los dos genotipos utilizado en este estudio: ratones control *chn2^{+/+}/Neu* y ratones deficientes en β 2-quimerina *chn2^{-/-}/Neu*.

2. Genotipado de los animales utilizados en el estudio

2.1 Extracción de ADN genómico

Para el genotipado de los ratones se obtuvo ADN genómico a partir de una sección de la cola de unos 0,5 cm obtenida en el momento del destete. El fragmento de cola se digirió en 500 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM, Tris HCl, pH 8,5, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM y SDS 0,2%) con 0,5 μ l de proteinasa K (20 μ g/ μ l, Roche), incubándose toda la noche a 55°C en un baño de agua. Al día siguiente se añadieron 250 μ l de NaCl 5M y tras una incubación de 10 minutos en hielo, las muestras se centrifugaron a 16.000 xg durante 10 minutos. 500 μ l del sobrenadante se transfirieron a un tubo nuevo y se añadió 1ml de etanol con el fin de precipitar el ADN. La mezcla se centrifugó 5 minutos a 10.000 xg y 4°C. A continuación, se decantó el alcohol, el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 μ l de agua milliQ.

2.2 Identificación de animales transgénicos *MMTV-ErbB2/Neu*

La presencia o ausencia del transgén *MMTV-ErbB2/Neu* se determinó mediante amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando los oligonucleótidos y condiciones de PCR recomendados por Jackson Laboratories. En la tabla 1 se indican los oligonucleótidos y el programa de amplificación utilizados.

Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones de PCR utilizadas para el genotipado de los animales transgénicos *MMTV-ErbB2/Neu*.

OLIGONUCLEÓTIDOS		
IMR 386	5'-TTT CCT GCA GCA GCC TAC GC-3'	
IMR 387	5'-CGG AAC CCA CAT CAG GCC-3'	
CONDICIONES DE PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	3 min	1
94 °C	20 seg	12
64 °C*	30 seg	
72 °C	35 seg	
94 °C	20 seg	25
58 °C	30 seg	
72 °C	35 seg	
72 °C	2 min	1
4 °C	∞	
*-0,5 °C por ciclo		

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello, los productos amplificados de ADN se separaron por tamaño en geles de agarosa al 1% en tampón TBE pH 8,4 (Tris 89 mM, Borato 89 mM, EDTA 2 mM) (BioRad) y se visualizaron mediante la tinción con Gel Red (Biotium). Se mezclaron 25 µl del volumen de la reacción de PCR con 5 µl de tampón de carga (6x) (50% glicerol, 1 mM EDTA, 0,4% de azul bromofenol). Después de cargar las muestras en el gel se les aplicó un voltaje de 100 voltios durante 30 minutos. Tras la electroforesis, el ADN se visualizó mediante un transiluminador Bio-RAD Gel Doc XR de luz ultravioleta. Los tamaños amplificados se compararon con un marcador de tamaño de bandas (øX174, Promega). En los ratones portadores del trasgén, tanto homocigotos como heterocigotos, se amplificó un fragmento de 600bp.

Para seleccionar los ratones homocigotos, portadores del trasgén en los dos alelos, se recurrió a la reacción de PCR cuantitativa (qPCR) utilizando los oligonucleótidos y las condiciones de PCR que se indican en la tabla 2. La reacción de qPCR se realizó utilizando Fast Start Universal SYBR Green Master 2x (Roche).

Tabla 2. Oligonucleótidos y condiciones del programa de qPCR utilizados en el genotipado de los animales transgénicos *MMTV-rbB2/Neu*.

OLIGONUCLEÓTIDOS		
oIMR1544	5'- CAC GTG GGC TCC AGC ATT 3'	
oIMR3380	5'- TCA CCA GTC ATT TCT GCC TTT G -3'	
oIMR1728	5'- CCC GAG TGT CAG CCT CAA A -3'	
oIMR1728	5'- GCA GGC TGC ACA CTG ATC A -3'	
CONDICIONES DE PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
50 °C	2 min	1
95 °C	10 seg	1
95 °C	15 seg	40
60 °C	1 min	
4 °C	∞	

2.3 Identificación de animales deficientes en β2-quimerina

Los animales portadores del “gene trap” en el gen *chn2*, responsable de la eliminación de β2-quimerina, se identificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos y las condiciones indicadas en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos y condiciones de PCR utilizadas en el genotipado de los ratones *chn2*.

OLIGONUCLEÓTIDOS		
chn2-F	5'-GCTGGTTCCTGAATTTTC-3'	
chn2-R	5'-GACTCTGCAAAAGCCATC-3'	
LTR	Propiedad de Lexicon Genetics	
CONDICIONES DE PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	5 min	1
94 °C	30 seg	40
58 °C	30 seg	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	∞	

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se indicó anteriormente. El fragmento correspondiente al alelo silvestre (WT) tiene un tamaño de 308 bp, mientras que el tamaño del fragmento correspondiente al alelo con la inserción del “gene trap” (KO) es de 163 bp (Fig. 17).

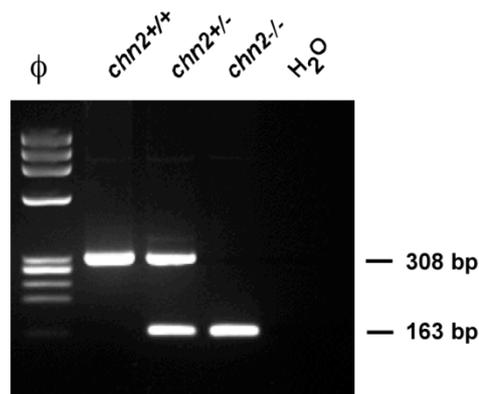


Figura 17. Análisis del genotipo de los ratones *chn2* mediante PCR. Fotografía de un gel de agarosa donde se separan los productos de PCR correspondientes a ratones WT (*chn2^{+/+}*), heterocigotos (*chn2^{+/-}*) y KO (*chn2^{-/-}*). En los ratones WT se obtiene una única banda de 308 bp, en los KO una banda de 163 bp y en los heterocigotos se amplifican las dos bandas. La primera línea del gel muestra el marcador de peso molecular ϕ X174.

3. Evaluación de la aparición y desarrollo de tumores de mama en los modelos murinos

Para evaluar el impacto de la eliminación de $\beta 2$ -quimerina en la aparición y desarrollo del cáncer de mama, se generaron grupos de hembras WT o KO para el gen *chn2* portadoras del transgén MMTV-ErbB2/Neu, y se comparó el desarrollo de los tumores de mama en ambos grupos. Los animales se monitorizaron semanalmente, por palpación, para determinar el inicio de la enfermedad. El tamaño mínimo del tumor de mama detectado fue de unos 5 mm y a partir de ese momento los tumores se midieron semanalmente con la ayuda de un calibre digital para calcular el volumen tumoral. El volumen individual se estimó según la fórmula²³²:

$$\text{Volumen} = \frac{1}{2} (\text{Diámetro mayor} \times \text{Diámetro menor}^2)$$

Los parámetros considerados para evaluar el desarrollo de la enfermedad fueron los siguientes:

- **Incidencia.** Indica el porcentaje de animales que desarrollan tumor.
- **Tiempo de latencia.** Tiempo que transcurre desde el nacimiento hasta la aparición del primer tumor.
- **Número de tumores** desarrollados por individuo
- **Multiplicidad tumoral**, entendida como el porcentaje de animales que desarrollan dos o más tumores.
- **Volumen total o carga tumoral.** Suma de los volúmenes individuales de los tumores de cada ratón.
- **Velocidad de crecimiento tumoral.** Este parámetro se calcula a partir de las medidas semanales del volumen de los tumores. El crecimiento tumoral sigue una cinética de crecimiento gompertziana, que consiste en un crecimiento exponencial que alcanza una fase de plateau²³³. En esta fase pueden existir variaciones en el volumen debidas a necrosis o a sangrado intratumoral además de una reabsorción en la fase final del crecimiento tumoral. Para evitar dichas variaciones las velocidades de crecimiento se calcularon teniendo en cuenta sólo las medidas de volumen tomadas en las primeras seis semanas de crecimiento. En este periodo de tiempo el tumor se encuentra generalmente en una fase constante de crecimiento, donde el tumor presenta un diámetro de entre 10 y 20 mm. Para comparar las velocidades de crecimiento se calcularon las pendientes de la recta formada tras la representación semilogarítmica de los volúmenes medidos en las primeras seis semanas.

4. Sacrificio de los animales y recogida de muestras

Todos los ratones utilizados en este estudio fueron sacrificados por asfixia en una cámara de CO₂. Los ratones se sacrificaron trascurridos 100 días desde

la aparición del tumor o, atendiendo a legislación vigente para evitar el malestar del animal, cuando alguno de los tumores desarrollados alcanzó en su diámetro mayor los 2 cm.

En el momento del sacrificio, se extrajeron los tumores de mama, los pulmones y las mamas que no habían desarrollado tumores. Los tumores de mama se dividieron en diferentes fragmentos; una parte se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para posteriores estudios de proteínas y otro fragmento se fijó en formaldehído al 4%, pH 7, estabilizado con metanol (Casa Álvarez), para posterior inclusión en parafina y estudios histopatológicos. Los pulmones se fijaron del mismo modo en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina para el posterior análisis de las metástasis. Las mamas sin tumores se procesaron para evaluar la presencia de lesiones preneoplásicas como se indicará más adelante.

5. Estudios histológicos

5.1 Inclusión de los tejidos en parafina

El estudio histopatológico de las muestras requiere de su inclusión en un medio sólido como la parafina, la cual permitirá seccionar posteriormente los tejidos. Los tejidos, tras ser fijados en formaldehído al 4% durante 24 horas se procesaron para su inclusión en parafina utilizando un procesador de tejidos automático (STP-120, Micron). Se realizaron una serie de pasos sucesivos en los cuales se fija el tejido en formol, seguido de una deshidratación en alcoholes que aumentan de concentración progresivamente. Finalmente el tejido se aclara con xileno, agente que sustituye el etanol y permite la mezcla con el medio de inclusión que se va a utilizar, la parafina. Los tiempos y agentes utilizados en cada fase del sistema automatizado se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Protocolo de inclusión de los tejidos en parafina.

PROCEDIMIENTO	MATERIAL	TIEMPO
DESHIDRATACIÓN	Alcohol 75%	1h
	Alcohol 75%	1h
	Alcohol 90%	1h
	Alcohol 96%	1h
	Alcohol 100%	1h
	Alcohol 100%	1h
ACLARAMIENTO	Xileno	1h
	Xileno	1h
	Xileno	1h
INCLUSIÓN	Parafina	2h
	Parafina	2h

Tras el procesamiento de los tejidos en parafina líquida, se procedió a la inclusión de los mismos en bloques, acordes a su tamaño, utilizando un centro de inclusión en parafina (MYR EC-350).

5.2 Tinción con hematoxilina-eosina

A partir de los bloques de parafina se realizaron cortes de 3 micras de grosor utilizando un microtomo de rotación (Microm HM 340E). Los cortes se depositaron en un baño de agua a 65°C donde se estiraron antes de colocarlos en portaobjetos cubiertos con polilisina (Sigma). Los portaobjetos se mantuvieron toda la noche en una estufa a 37°C antes de comenzar con la tinción manual. Las soluciones utilizadas y tiempos de incubación que se siguieron en la tinción están detallados en la tabla 5.

Tabla 5. Protocolo de tinción con hematoxilina y eosina

PROCEDIMIENTO	MATERIAL	TIEMPO
DESPARAFINADO	Xileno	5 min
	Xileno	5 min
	Alcohol 100%	2 min
REHIDRATACIÓN	Alcohol 96%	2 min
	Alcohol 70%	2 min
	Agua del grifo	1 inmersión
TINCIÓN	Hematoxilina de Harris	5 min
	Agua del grifo	5 min
	Alcohol ácido	3-inmersiones
	Eosina	30 seg
	Agua del grifo	5 min
DESHIDRATACIÓN	Alcohol 70%	2 min
	Alcohol 96%	2 min
	Alcohol 100%	2 min
ACLARAMIENTO	Xileno	5 min
	Xileno	5 min

5.3 Evaluación histopatológica

La evaluación histopatológica de los tumores de mama se realizó con el asesoramiento de la Dra. García-Rostán (IBGM, Valladolid). Para ello se evaluaron diversas características tumorales en los cortes de los tumores teñidos con hematoxilina-eosina.

- **Grado histológico (H&E).** El grado histológico de cada tumor primario se evaluó siguiendo el método de Elston y Ellis²³¹. Se valoraron tres características, la apariencia general del tumor (formación tubular), las áreas de mayor atipia (pleomorfismo nuclear) y la actividad mitótica (índice mitótico). Se asignó un valor numérico de 1 a 3 para cada característica. Los tres valores se sumaron dando valores en un rango de 3 a 9 que corresponden a tres grados: grado I, (3-5 puntos), grado II (6-7 puntos) y grado III (8-9 puntos).
- **Evaluación de los cambios degenerativos y grado de necrosis.** Se entienden como cambios degenerativos aquellos cambios progresivos que el tumor que incluyen en las primeras fases la presencia de zonas hemorrágicas pasando a la aparición de zonas de necrosis y degeneración quística. El grado de necrosis en los tumores puede clasificarse en tres grados, según el patrón que muestren. Así, se considerarán de grado I los tumores con zonas donde de necrosis pequeñas que se encuentran espaciadas en el tejido y cuya presencia es poco frecuente. El grado II se caracteriza por grandes áreas de necrosis que se extienden por la totalidad del tumor y el grado III se considera cuando las áreas de necrosis con masivas llegando incluso a sustituir las zonas donde se encuentran las células tumorales viables.
- **Patrón vascular.** Otro de los fenotipos evaluados en los tumores de las dos poblaciones de ratones analizados fue el patrón vascular. Los patrones vasculares de los tumores permitieron la agrupación de las muestras en tumores con un patrón vascular I (capilares ramificados con paredes finas entremezclados con los vasos sanguíneos normales) y patrón vascular II (capilares ramificados ocasionalmente dilatados varios órdenes de magnitud y vasos normales que crean una red de vascularización).

5.4 Cuantificación de focos metastásicos en pulmón

Teniendo en cuenta que este modelo de cáncer de mama sólo metastatiza a pulmón, se cuantificó el número de focos de metástasis que presentaban los pulmones de ambos genotipos. Para realizar este estudio se seleccionaron los pulmones de aquellos animales que habían desarrollado tumores en alguna de sus mamas y los cuales se permanecido una media de 2,5 meses de enfermedad antes del sacrificio. Se realizaron cortes seriados de los pulmones, incluidos en parafina, procedentes de ratones que habían desarrollado tumores de mama y que fueron sacrificados entre 2 y 3 meses tras la aparición de la enfermedad. Los

cortes se realizaron con un grosor de 3 micras, desbastando 100 micras entre cada corte. Los corte se montaron en portaobjetos y se tiñeron con H&E como se explicó anteriormente. Se contabilizaron los impactos metastásicos examinando los cortes con un microscopio óptico (Nikon).

5.5 Inmunohistoquímica

Para este estudio se utilizaron cortes de 3 micras de los tumores de mama incluidos en parafina. Las tinciones se realizaron en el Servicio de Histología del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y la evaluación de las mismas fue realizada por la Dr. García-Rostán.

Los marcadores utilizados para la evaluación inmunohistoquímica permitieron estudiar en profundidad diferentes procesos modulados por la proteína β 2-quimerina que son relevantes en la patología del cáncer de mama. Así se cuantificó la proliferación celular, la muerte celular por apoptosis, o los contactos intercelulares mediante tinción con anticuerpos anti-Ki67, anti-caspasa-3 *cleaved* y anti-E-cadherina respectivamente. Por otra parte, para el estudio de la vascularización tumoral se tiñeron las secciones con anticuerpo anti-CD31. Las muestras fueron analizadas y fotografiadas con un microscopio óptico (Nikon) equipado con una cámara digital Nikon (DXM1200C).

5.6 Detección y cuantificación de lesiones preneoplásicas mediante tinción con alumbre carmín

Las mamas no afectadas por la presencia de tumores, de los ratones que desarrollaron tumores, se analizaron mediante la técnica denominada “whole mount”, para la cual, las glándulas mamarias fueron extendidas en un portaobjetos de vidrio manteniendo el tamaño y la forma. Una vez extendidas, las mamas fueron fijadas de 2 a 4 horas con fijador de Carnoy (Tabla 6). A continuación, las muestras se lavaron con etanol al 70% durante 15 minutos y se procedió a hidratar las muestras, pasando por diferentes etanoles hasta llegar a agua destilada. Una vez hidratadas, las glándulas mamarias se tiñeron con la solución de tinción alumbre carmín (Tabla 6) a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron las muestras y se deshidrataron mediante lavados de 15 minutos con etanol al 70%, etanol al 95% y etanol al 100%, seguido de xileno en el que permanecieron toda la noche. Posteriormente, las muestras se montaron en medio de montaje Entellán (Fisher) y se dejaron secar. Las preparaciones fueron analizadas y fotografiadas con una lupa (OLYMPUS-SZ) equipada con una cámara digital (OLYMPUS E-33).

Tabla 6. Composición de las soluciones empleadas para la tinción de las glándulas mamarias de ratón

Solución de Fijación Carnoy		
Compuesto	Concentración	Casa Comercial
Etanol 100%	60% (v/v)	Merk
Cloroformo	30% (v/v)	Merk
Ácido acético glacial	10% (v/v)	Merk
Solución de tinción Alumbre Carmín		
Compuesto	Concentración	Casa Comercial
Carmín	2 g/l	Sigma
Sulfato de aluminio y potasio	5 g/l	Sigma

La solución de alumbre carmín se prepara mezclando los reactivos con agua destilada e hirviendo la mezcla durante 20 min. Posteriormente la solución se filtra y se mantiene a 4 C en oscuridad.

6. Líneas celulares y condiciones de cultivo

En este estudio han utilizado dos líneas celulares representativas dos de los subtipos principales de cáncer de mama.

- **MCF-7.** Es una línea celular epitelial representativa de tumores luminales (Luminal A). Las células son positivas para receptores de estrógenos y progesterona y negativas para el receptor HER2. Posee varias características del epitelio mamario diferenciado. En condiciones de alta confluencia celular, estas células son capaces de formar cúmulos celulares en forma de cúpula.
- **MDA-MB-231-LM2-4175 (LM2).** Esta línea celular fue amablemente cedida por el Dr. Massagué (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, NY, USA). Esta línea deriva de la línea MDA-MB-231, células representativas de tumores triple negativos/basales y *Claudin-low*, ya que no expresan receptores de estrógenos, progesterona ni HER2. Las células MDA-MB-231 tienen características mesenquimales, son altamente metastásicas, oncogénicas y tienen baja expresión de genes implicados en las uniones célula-célula.

La línea LM2 fue obtenida en el laboratorio del Dr. Massagué a partir la línea MDA-MB-231, que se infectó con un vector retroviral, el cual, entre otras proteínas, contaba con la proteína fluorescente verde (GFP) como epítipo marcador. Las células fueron inyectadas a través de la vena de la cola en un modelo de ratón y se aislaron aquellas que rápidamente metastatizaron al pulmón (LM1 del inglés *lung metastasis 1*). El proceso de selección se repitió con la población LM1 revelando mayor potencial metastásico en este segundo caso (LM2) (Fig.18).

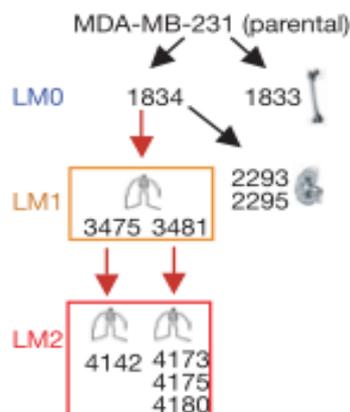


Figura 18. Selección de células de cáncer de mama que metastatizan a pulmón (línea LM2). Esquema del proceso de selección *in vivo* de subpoblaciones de la línea MDA-MB-231 con potencial metastásico a pulmón. Las células MDA_MB-231 se inyectaron en la vena de ratones inmunodeficientes y se procedió a varias rondas de selección de las células a partir de las metástasis pulmonares (LM0, LM1 y LM2). (Adaptado de Minn *et al*, 2005).

Tanto las células MCF7 como las LM2 se cultivaron en medio DMEN (Life technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen), 1% de L-glutamina (Life technologies), 1% de penicilina- estreptomycin (Life technologies), al que denominamos DMEN completo. Todas las células se cultivaron en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂.

7. Generación de líneas celulares estables

Se generaron líneas celulares que expresan de manera estable β 2-quimerina mediante la transfección de las células MCF7 y LM2 con vectores de expresión para esta proteína y posterior selección como se indica a continuación.

7.1 Plásmidos

El vector de expresión que codifica la proteína β 2-quimerina fusionada con la proteína fluorescente verde (EGFP) (pEGFP-N1-chn2) fue generado en dos pasos. En primer lugar se realizó una sustitución entre el codón de fin de la traducción de la proteína β 2-quimerina y el sitio de corte específico para la enzima de restricción XmaI. Para la sustitución realizamos una mutagénesis por PCR usando como ADN molde el plásmido pCEFL-HA-chn2 y los oligonucleótidos sentido 5'-AATAAAGCTTGCCACCATGTACGACGTTCTGATTACGC-3' y antisentido 5'-TCCCCCGGGTGAATAAACGTCTTCGTTTTTC-3' (la secuencia del sitio de restricción XmaI utilizada para la clonación aparece subrayada). A continuación digerimos el plásmido resultante con HindIII (Fermentas) y XmaI (New England Biolabs) para subclonar el fragmento liberado en el vector pEGFP-N1 (Clontech)

en pauta de lectura con la secuencia de la EGFP utilizando los sitios de restricción HindIII y XmaI. El vector de destino pEGFP-N1 fue mutado previamente al subclonaje de la proteína β 2-quimerina para la delección de su codón de inicio (ATG). Para la delección realizamos una mutagénesis por PCR utilizando el kit de mutagénesis Quickchange II Site directed mutagénesis, utilizando como molde el plásmido pEGFP-N1 y los oligos sentido 5' GCCGGTCGCCACCGTGAGCAAGGGCG 3' y antisentido 5' CGCCTTGCTCACGGTGGCGACCGG 3'.

La estrategia utilizada para la generación del vector pOFP-N1-chn2 de expresión que codifica para la proteína β 2-quimerina fusionada con la proteína fluorescente naranja (OFP), consistió en el intercambio de la secuencia que codifica para la proteína EGFP del plásmido pEGFP-N1-chn2 por la de la proteína OFP del plásmido pmORANGE (Clontech). En primer lugar, realizamos una delección del codón de inicio (ATG) de la proteína fluorescente naranja mediante mutagénesis por PCR como se indicó anteriormente, utilizando como molde el plásmido pmORANGE y los oligos sentido 5'-CCGGTCGCCACCGTGAGCAAGGGC-3' y antisentido 5'-GCCCTTGCTCACGGTGGCGACCGG - 3'. El plásmido resultante se digirió con las enzimas de restricción XmaI y NotI (Thermo scientific) para liberar la secuencia que codifica la proteína OFP. De la misma manera, el plásmido pEGFP-N1-chn2 se digirió con las mismas enzimas de restricción para liberar la secuencia que codifica la proteína EGFP. El fragmento correspondiente a la OFP se subclonó entonces en este vector en pauta de lectura con la secuencia de β 2-quimerina.

7.2 Transfecciones

La generación de las subpoblaciones de las líneas MCF7 y LM2, con expresión estable de β 2-quimerina, se realizó por transfección de los plásmidos descritos anteriormente con lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo la indicaciones del fabricante. En el caso de las células MCF7 se utilizó el plásmido pEGFP-N1-chn2 y para las células LM2 se utilizó el plásmido pOFP-N1-chn2.

7.3 Selección de las poblaciones control y β 2-quimerina

Una vez transfectadas las dos líneas celulares con los plásmidos correspondientes, se sustituyó el medio de cultivo DMEN completo por el mismo medio pero suplementado con 500 μ g/ml de geneticina 480 (Invitrogen), de manera que sólo las células que contasen con el plásmido, que incluye un gen de resistencia a geneticina sobreviven al cabo de una semana. Las células seleccionadas por resistencia a la geneticina se expandieron y fueron separadas posteriormente por citometría de flujo para obtener las células que expresan β 2-quimerina fusionada a la correspondiente proteína fluorescente.

7.4 Purificación de subpoblaciones mediante citometría de flujo

Para la preparación de las muestras y su posterior selección mediante citometría de flujo se contabilizaron las células y se resuspendieron en una concentración final de entre $10\text{-}15 \times 10^6$ células viables/ml y un máximo de 2 ml. Las células se filtraron en tubos de citómetro con filtro de 30 micras y se separaron mediante citometría de flujo utilizando un *cell sorter* (FACSAria). Se obtuvieron las subpoblaciones de células fluorescentes que expresaban $\beta 2$ -quimerina" (MCF7- $\beta 2$ -quimerina y LM2- $\beta 2$ -quimerina) y se recogieron las células no fluorescentes que se utilizaron como líneas control. Estas células se mantuvieron en medio DMEN completo suplementado con 250 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina.

8. Análisis de expresión proteica

El análisis de la expresión de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, western blot e inmunodetección con anticuerpos específicos. Este estudio se realizó del mismo modo tanto en tejidos tumorales como en líneas celulares de tumor de mama, realizando los pasos que se describen a continuación.

8.1 Extracción de proteínas

- *Extracción de proteínas de tumores.* Para este análisis se utilizaron los fragmentos de tumor de mama conservados a -80°C . Se pesaron los tumores y se añadió tampón de lisis (TisHCl50mM, pH 7,6, NaCl150mM, TritonX-100 1%, EDTA 2mM, MNa_3VO_4 1mM, DTT2mM, NaDOC0, 2%, NaF50mM en agua milliQ) junto con una mezcla de inhibidores de proteasas (Cømplete, Roche Molecular Biochemicals) en proporción 1:10 (p/v). Esta mezcla se homogeneizó con la ayuda de un politrón (Ultra TurraxT8.01, IKA). 1ml del homogenado se centrifugó a 10.000g durante 10min a 4°C y se recogió el sobrenadante par determinación de proteínas y posterior análisis.
- *Extracción de proteínas de líneas celulares.* Para la extracción de proteínas de líneas celulares, cultivos de aproximadamente 250.000 células se lavaron en PBS (*Phosphate Buffered Saline*) y se lisaron en 200 μL del tampón de lisis indicado anteriormente.

8.2 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína de la muestra se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-RAD). Para ello se realizó una curva patrón usando como estándares cantidades crecientes de albúmina bovina sérica (BSA). La absorbancia de la muestra patrón y de las muestras problema se midió a 595nm utilizando un espectrofotómetro.

8.3 Geles de poliacrilamida, Western blot e inmunodetección

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 8, 10 o 12% dependiendo del peso molecular de las proteínas a detectar, donde se separaron 50 µg del lisado de las muestras por electroforesis utilizando un tampón de carrera conteniendo Tris 0,25M, glicina 2M y SDS 0,05%. Tras la electroforesis las muestras se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Schleider and Schuel) por Western blot utilizando un tampón de transferencia húmeda compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%. La transferencia se llevó a cabo utilizando un aparato Mini Trans-BlotCell (Bio-Rad). Para verificar la eficiencia de la transferencia la membrana de nitrocelulosa se tiñó con solución Ponceau S (Sigma).

Para la inmunodetección con anticuerpos específicos se realizó un paso previo de bloqueo de la membrana con leche desnatada al 5% en la solución TBS-T (Tris-HCl 25mM, pH 8, conteniendo un 0,1% de Tween-20). Esta incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora y es necesaria para evitar las uniones inespecíficas que pudiera tener el anticuerpo primario a la membrana de nitrocelulosa. Tras el bloqueo se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo primario preparado en TBS-T con 5% de leche desnatada (Tabla 7). Este anticuerpo se incubó toda la noche a 4°C o 1h a temperatura ambiente en agitación. Tras ese tiempo se lavaron las membranas tres veces con TBS-T y se procedió a la incubación (1h a temperatura ambiente) con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (Horseradish Peroxidase) (GE Healthcare). Después la incubación, la membrana se lavó 3 veces en TBS-T durante 10 min.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para determinar la expresión proteica

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	PESO MOLECULAR (Proteína)	DILUCIÓN	Ab. 2ª
Anti-actina	Sigma	42 kDa	1:1000	ratón
Anti-AKT	Cell signaling	60 kDa	1:1000	conejo
Anti-p-AKT	Cell signaling	60 kDa	1:1000	conejo
Anti-β2-quimerina	Sigma	50 kDa	1:50000	rata
Anti-β-catenina	Sigma	95 kDa	1:1000	conejo
Anti-caspasa 3-activa	Cell signaling	17 kDa	1:1000	conejo
Anti-ciclina D1	Santa Cruz	37 kDa	1:1000	conejo
Anti-E-cadherina	Santa Cruz	120 kDa	1:1000	conejo
Anti-ERK	Cell signaling	42/44 kDa	1:1000	conejo
Anti-p-ERK	Cell signaling	42/44 kDa	1:1000	conejo
Anti-Rac	Cell signaling	22 kDa	1:1000	ratón

La detección de las proteínas se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (GE Healthcare) y unas películas fotográficas (Fuji). Cuando fue necesario eliminar la señal procedente de la reacción de la HRP se procedió a la incubación de la membrana con azida sódica antes de incubar con el nuevo anticuerpo primario y continuar el proceso como se ha descrito.

9. Purificación de la proteína de fusión GST-PBD

El dominio de unión a Rac de Pak (PBD) fusionado a GST se utilizará en los ensayos de “pull-down” (que se explican a continuación). El procedimiento de purificación consta de las siguientes etapas:

- Crecimiento de E.coli e inducción.* Un cultivo de bacterias BL-21 transformadas con el vector de expresión pGEX-PBD fue crecido durante toda la noche a 37°C en medio de Luria-Bertani conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. A la mañana siguiente el cultivo fue diluido hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,2-0,3 y crecido de nuevo hasta una densidad óptica a 600 nm de entre 0,4-0,7 absorbancia indicativa de que las bacterias se encuentran en la fase exponencial de crecimiento y en este momento se indujo la expresión de la proteína de fusión mediante la adición al cultivo de isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) (GE-Healthcare) a una concentración final de 0,5 mM. Transcurridas 4-5 h a 37°C las bacterias se recogieron por centrifugación a 6.000 xg durante 15 min a 4°C.
- Lisis e incubación con glutatión-sefarosa.* Las bacterias se resuspendieron en 40 ml de PBS frío con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) y se sonicaron durante 2 min en pulsos de 15 segundos. A continuación se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1% incubándose la mezcla en hielo durante 30 min. Tras este tiempo se centrifugó la mezcla a 10.000 xg durante 20min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se añadió una suspensión al 50% de una matriz de sefarosa conjugada con glutatión (GE-Healthcare). La mezcla se incubó durante 2h a 4°C con rotación y posteriormente se centrifugó a 2000 xg para sedimentar la matriz de glutatión-sefarosa unida a GST-PBD. La matriz se lavó tres veces con PBS frío.
- Elución de RBD-GST.* La proteína GST-PBD se eluyó de la matriz de glutatión-sefarosa mediante incubación con 400 µL de glutatión (10mM en 50mM de Tris-HCl a pH 8) durante 10 min a temperatura ambiente seguida de centrifugación. Se recogió el sobrenadante y el proceso se repitió un total de tres. Para eliminar el glutatión se utilizó una columna de desalado PD-10 (GE-Healthcare). La proteína purificada se almacenó en una solución de glicerol al 50% en PBS a -80°C hasta su uso posterior.
- Cuantificación GST-RBD.* La concentración de proteína de la muestra se determinó por espectrofotometría por el método de Bradford utilizando el

reactivo Bio-Rad *Protein Assay* como ya se ha explicado. Para evaluar la calidad de la purificación se analizó una muestra de la proteína por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, utilizando como estándares cantidades crecientes de BSA (fracción V, Sigma). Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0,5% Coomassie, 10% ácido acético, 50% metanol) y se lavaron con una solución de desteñido (10% ácido acético, 50% metanol) para visualizar las proteínas (Fig. 19).

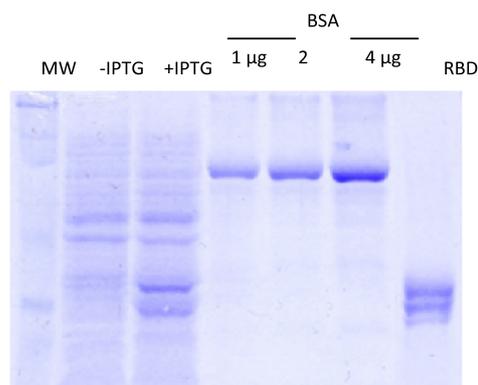


Figura 19. Gel de poliacrilamida al 10% mostrando la purificación de GST-PBD. Líneas 2 y 3, lisado de las bacterias antes y después de la inducción con IPTG. Líneas 4 a 6, BSA. Línea 7, proteína GST-PBD purificada.

10. Ensayo de activación de Rac o *Pull Down*

El nivel de activación de Rac se determinó en muestras de tumores de mama y en líneas celulares de cáncer de mama mediante un ensayo de *pull down*.

Tras sembrar el mismo número de células de las poblaciones a comparar sobre cristales de 18mm de diámetro sin tratar (sin la cobertura de ningún sustrato), se incubaron durante toda la noche para permitir la adhesión de las células a los mismos. Las células adheridas a los cristales se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante a 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron de nuevo dos veces durante 5 minutos con PBS y se permeabilizan con 0,2% de Triton X-100 (Sigma) con 100nM de glicina (Fisher) en PBS durante 10 minutos. Tras otros dos lavados con PBS se bloquearon los sitios inespecíficos de unión mediante incubación con 3% de BSA (Sigma) en PBS (solución de bloqueo) durante 30 minutos. La detección de las proteínas de interés se llevó a cabo utilizando los anticuerpos primarios correspondientes disueltos en solución de bloqueo que se incubaron durante 1h a temperatura ambiente. Para la visualización de E-cadherina se utilizó una dilución 1:200 de anticuerpo anti-E-cadherina (BD Transduction Laboratories). La detección de vinculina se realizó mediante incubación con una dilución 1:200 de anticuerpo anti-vinculina (Sigma). Tras lavar las células con PBS durante 5

minutos se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 647) en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Tras una incubación de 30 minutos con el anticuerpo secundario, las células se lavaron con PBS y se incubaron con DAPI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBS) durante 5 minutos. El citoesqueleto de actina se tiñó incubándolas células durante 20 min con faloidina conjugada con Alexa Fluor 647 (Cell Signaling) diluida 1:100 en solución de bloqueo. Finalmente las preparaciones se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje (*ProLong Gold Antifade Reagent*). Las células fueron analizadas mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio OLYMPUS Fluoview 1000.

11. Inmunofluorescencia

Tras sembrar el mismo número de células de las poblaciones a comparar sobre cristales de 18mm de diámetro sin tratar (sin la cobertura de ningún sustrato), se incubaron durante toda la noche para permitir la adhesión de las células a los mismos. Las células adheridas a los cristales se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante a 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron de nuevo dos veces durante 5 minutos con PBS y se permeabilizan con 0,2% de Triton X-100 (Sigma) con 100nM de glicina (Fisher) en PBS durante 10 minutos. Tras otros dos lavados con PBS se bloquearon los sitios inespecíficos de unión mediante incubación con 3% de BSA (Sigma) en PBS (solución de bloqueo) durante 30 minutos. La detección de las proteínas de interés se llevó a cabo utilizando los anticuerpos primarios correspondientes disueltos en solución de bloqueo que se incubaron durante 1h a temperatura ambiente. Para la visualización de E-cadherina se utilizó una dilución 1:200 de anticuerpo anti-E-cadherina (BD Transduction Laboratories). La detección de vinculina se realizó mediante incubación con una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-vinculina (Sigma). Tras lavar las células con PBS durante 5 minutos se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 647) en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Tras una incubación de 30 minutos con el anticuerpo secundario, las células se lavaron con PBS y se incubaron con DAPI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBS) durante 5 minutos. El citoesqueleto de actina se tiñó incubándolas células durante 20 min con faloidina conjugada con Alexa Fluor 647 (Cell Signaling) diluida 1:100 en solución de bloqueo. Finalmente las preparaciones se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje (*ProLong Gold Antifade Reagent*). Las células fueron analizadas mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio OLYMPUS Fluoview 1000.

12. Análisis de la adhesión a colágeno tipo IV

Para el análisis de la adhesión celular se incubaron placas de 20 pocillos con 500 μl de colágeno IV (Sigma)/pocillo a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 4h a temperatura ambiente. Tras el periodo de incubación se lavaron los pocillos

dos veces con PBS y se sembraron 40.000 células en 1ml de medio por pocillo. Las células se mantuvieron en condiciones estándar (37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 55% de humedad) y fueron fijadas con 1ml de formaldehído al 8% por pocillo (de manera que la concentración final fuese del 4%) a intervalos de 10 minutos durante 1h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se procedió a su análisis mediante microscopía confocal. El área de las células individuales fue calculada automáticamente con ayuda del software proporcionado por el programa de análisis de imagen *Fiji (ImageJ)*.

13. Ensayo de adhesión intercelular mediante cultivo en gotas colgantes (*hanging drops*)

Con el objetivo de determinar los contactos célula-célula, sin interferencia de los contactos que las células puedan establecer con el sustrato, se realizó un ensayo de cultivo en gotas colgantes (*hanging drops*) en las líneas MCF7 y MCF7-β2-quimerina. Para ello, se sembraron 5.000 células/gota de 30 μL en la tapa de placas de 10cm, las gotas se incubaron durante toda la noche en condiciones estándar (37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 55% de humedad). Trascorridas 12h se observaron las estructuras generadas y se disgregaron mecánicamente mediante el pipeteo de las mismas un total de 10 veces. Las estructuras resultantes de la disgregación mecánica se evaluaron y fotografiaron utilizando un microscopio (Nikon Eclipse TS100) acoplado a una cámara digital (Nikon DS-5M). El diámetro de los agregados se determinó mediante el programa de análisis de imagen *Fiji (ImageJ)*

14. Análisis de migración mediante ensayo de “cierre de herida” o “wound healing”

Para este experimento se sembraron 200.000 células/pocillo de las líneas LM2 y LM2-β2-quimerina en placas de 24 pocillos y se incubaron durante toda la noche en condiciones estándar (37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 55% de humedad) para asegurar la formación de una monocapa de células confluyente al inicio del ensayo. Antes de comenzar el experimento se fijaron las condiciones en la cámara climatizada acoplada al microscopio confocal (OLYMPUS Fluoview 1000) para establecer condiciones similares a las de un incubador que permiten realizar experimentos de larga duración. Cuando las condiciones de la cámara se estabilizaron se realizó una “herida” longitudinalmente sobre el fondo de las placas, de forma que se interrumpe la monocapa de células. A continuación, se lavaron los pocillos con PBS para eliminar las células que se han desprendido y añadió 1ml de medio DMEM sin suero o suplementos, de forma que nos aseguremos de que no existan interferencias de proliferación con la migración. Se fijó la posición donde se monitorizará el cierre de la herida y se tomaron fotos con una frecuencia de 5 minutos para hasta un total de 200 imágenes con el objetivo de 10 X. El análisis de la velocidad de migración se determinó mediante el programa de análisis de imagen *Fiji (ImageJ)*

15. Análisis de la invasión

En el ensayo de invasión se utilizaron placas de 24 pocillos con insertos que presentaban poros de 8 μ m de tamaño (Costar) sobre las cuales se incubó durante 1h a temperatura ambiente una capa de 100 μ l de Matrigel (Becton Dickinson) diluido en DMEM sin FBS (1:20). Se siembran 250.000 células, de las líneas LM2 y LM2- β 2-quimerina en la cámara superior de las placas suspendidas en 200 μ l de DMEM sin FBS y se rellenó la cámara inferior con 750 μ l de DMEM con 10% de FBS como quimioatrayente. Las células se incubaron en condiciones estándar durante 18-30h. Al finalizar el tiempo fijado para la invasión celular, se eliminó el medio, se lavaron los pocillos con PBS y se fijaron las células presentes en el inserto con formaldehído al 4% durante 2 min. Los insertos se lavaron de nuevo y se permeabilizaron las células con metanol 100% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para el análisis de las células por microscopía se realizó una tinción con 0,1% cristal violeta (Sigma) en 20% metanol.

16. Experimento de formación 'de novo' de contactos intercelulares mediados por calcio.

Para evaluar la formación *de novo* de contactos intercelulares, se utilizaron las MCF7 y MCF7- β 2-quimerina. Se sembró el mismo número de células sobre cristales de 18mm de diámetro tras haber sido centrifugadas y resuspendidas en DMEM sin FBS ni calcio (PAN Biotech). Las células fueron incubadas durante toda la noche en condiciones estándar (37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 55% de humedad) y posteriormente se procedió a restablecer los contactos intercelulares sustituyendo el medio de cultivo por DMEM sin FBS pero con calcio (PAN Biotech). Las células fueron fijadas a intervalos de 15minutos durante 2h con formaldehído al 4% para ser procesadas posteriormente por técnicas de inmunofluorescencia ya explicadas.

17. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa *GraphPad Prism5*. Los datos se analizaron mediante diferentes test estadísticos dependiendo del caso. Los test utilizados en cada experimento se indica en la leyenda correspondiente a la figura. Los resultados obtenidos del análisis del cáncer de mama en modelos animales se analizaron utilizando generalmente el test no paramétrico *U de Mann Whitney* para estudios entre dos grupos que no se ajustan a una distribución normal de Gauss. Para la evaluación de la curva de supervivencia se recurrió al método *Kaplan-Meier* cuyas curvas se comparan por *long-rank test*. Los datos de la evaluación histopatológica se analizaron mediante el test *U de Mann Whitney* en el caso de dos variables o el test de *Chi cuadrado* en el caso de más de dos variables cualitativas.

Materiales y Métodos

En el caso de los datos obtenidos en los estudios realizados en líneas celulares se utilizó el test t de Student (*t-test*) para muestras no pareadas, pues se trataba de muestras independientes procesadas en paralelo en cada uno de los triplicados o el test ANOVA en el caso de que se comparasen más de dos grupos de variables cuantitativas.

RESULTADOS

1. Generación de un modelo murino de cáncer de mama deficiente en β 2-quimerina

Para evaluar el papel de β 2-quimerina en el desarrollo del cáncer de mama *in vivo* se generó un modelo de ratón en el que se eliminó la expresión de esta isoforma de las quimerinas en ratones MMTV-ErbB2/Neu. Para ello, se utilizaron ratones knockout (KO) de β 2-quimerina que se obtuvieron de la compañía Lexicon Genetics y fueron generados mediante mutagénesis por inserción de vectores retrovirales (*gene-trap*). En la figura 20A se muestra el punto de inserción del vector retroviral en el gen que codifica para β 2-quimerina (gen *chn2*). Este gen codifica para las isoformas β 1- y β 2-quimerina, que se generan a partir de dos inicios de transcripción localizados en dos regiones promotoras diferentes, uno localizado aguas arriba del exón 1, que genera la isoforma β 2-quimerina y otro en el intrón 6, que genera la isoforma β 1-quimerina. Puesto que la inserción retroviral se produjo en el intrón 1, estos ratones KO (ratones *chn2*^{-/-}) son específicos de la isoforma β 2-quimerina y no se afecta la expresión de la isoforma β 1-quimerina. Para corroborar la validez de estos ratones para este estudio, comprobamos mediante Western blot la expresión de β 2-quimerina en tejido de mama de los ratones silvestres (WT) y la ausencia de expresión de esta proteína en tejido de mama de los ratones *chn2*^{-/-} (Fig. 20B).

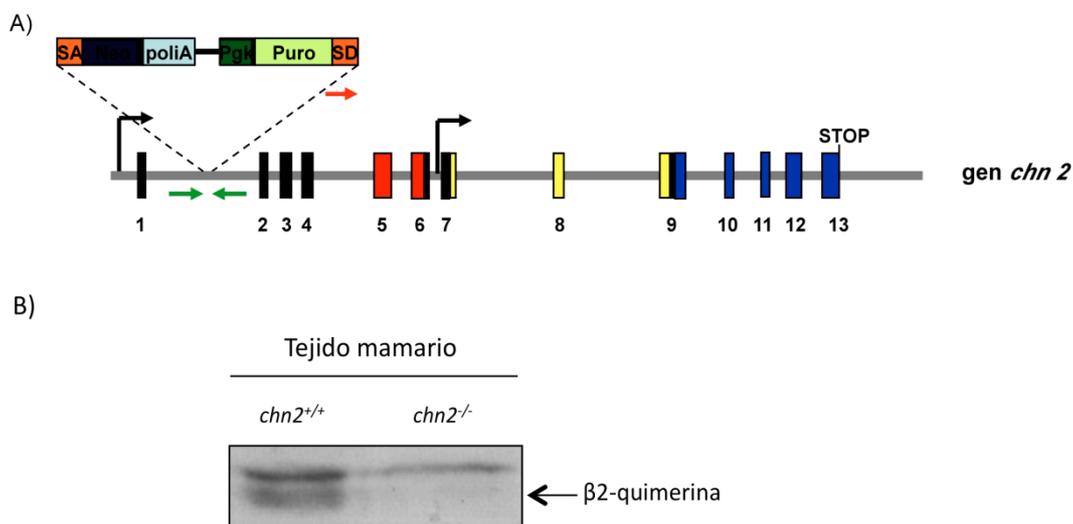


Figura 20. Generación del ratón knockout de β 2-quimerina. **A)** Representación esquemática de la inserción en el gen *chn2* de la trampa genética (*gene-trap*) utilizada para generar el ratón KO de β 2-quimerina. Los promotores de las isoformas β 2- y β 1- se señalan con una flecha. **B)** Western blot del lisado del tejido mamario de ratones adultos WT (*chn2*^{+/+}) y KO (*chn2*^{-/-}) demostrando la expresión de β 2-quimerina en la mama de los ratones WT y la eliminación de la expresión en este tejido en los ratones KO.

Los ratones *chn2*^{-/-} se cruzaron con los ratones MMTV-ErbB2/Neu, que sobreexpresan el protooncogén *ERBB2/Neu* bajo el promotor LTR (Long Terminal Repeats) del MMTV (Mammary Mouse Tumor Virus) y desarrollan cáncer de mama de manera espontánea antes de 1 año de edad. Previamente a la generación de los distintos grupos experimentales, se procedió a la homogeneización del fondo genético de los ratones. Los ratones MMTV-ErbB2/Neu se encontraban en un fondo genético FVB y el ratón *chn2*^{-/-} en un fondo genético C57Bl6. Dada la influencia del fondo genético en la susceptibilidad a la aparición del cáncer de mama y en su evolución, se realizaron cinco retrocruces de los animales doble heterocigotos *chn2*^{-/-}/*Neu*^{+/-} hacia fondo FVB, alcanzándose aproximadamente un 97% de fondo FVB. A partir de cruces entre estos animales se generaron los genotipos utilizados en este estudio, ratones *chn2*^{+/+}/*Neu* y *chn2*^{-/-}/*Neu*, que a partir de ahora se nombrarán control y KO respectivamente.

Para comprender mejor el papel de β 2-quimerina en los distintos aspectos del cáncer de mama se estudiaron aspectos temporales de la enfermedad, como el tiempo de latencia y la incidencia. También se analizó el fenotipo tumoral a través de la evaluación histopatológica y la comparación de aspectos propiamente tumorales que reflejan el desarrollo de la enfermedad, como son la multiplicidad, la carga tumoral, el volumen del tumor primario y la velocidad de crecimiento del mismo. Finalmente se analizó la capacidad de diseminación de las células tumorales de la mama al pulmón, ya que este modelo de ratón se caracteriza por presentar metástasis exclusivamente a ese órgano.

2. Análisis de los tumores de mama en ratones MMTV-ErbB2/Neu deficientes en β 2-quimerina

2.1 Análisis de la incidencia y tiempo de latencia

Para realizar este estudio se mantuvieron un total de 35 hembras control y 45 hembras KO durante 13 meses para analizar el desarrollo y progresión del cáncer de mama. En la figura 21A se representa la curva de supervivencia de los ratones libres de tumor que permite analizar el tiempo de latencia (tiempo que transcurre desde que nace el animal hasta la aparición del primer tumor detectable). Como podemos observar, existe una diferencia significativa ($p < 0,001$) en el tiempo de latencia que presentan los diferentes genotipos. Mientras que la edad media para la aparición de tumores de mama en los ratones KO es de 8 meses, la media del grupo control es superior, de 11 meses.

En cuanto a la incidencia, es decir, el porcentaje de animales que desarrollan tumor, el 96,56% de los ratones KO desarrollaron tumores antes de 13 meses de edad frente al 77,14% de los ratones WT, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (Fig. 21B).

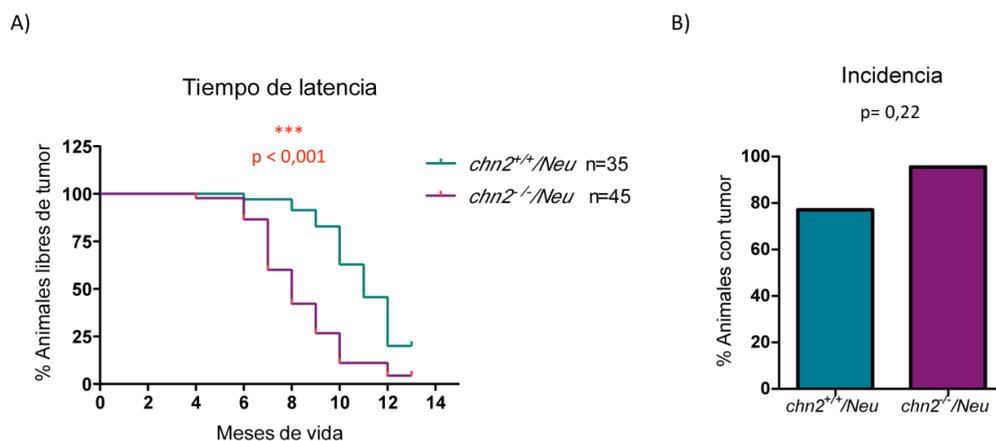


Figura 21. Curva de supervivencia Kaplan Meier e incidencia tumoral. A) Curva de supervivencia Kaplan-Meier para los dos genotipos de ratones analizados, grupo control ($chn2^{+/+}/Neu$) y KO de $\beta 2$ -quimerina ($chn2^{-/-}/Neu$). Se representan los tiempos de latencia, con una media de 8 meses para el KO frente a los 11 meses del grupo control. Ambas curvas se compararon mediante el *log-rank test*. B) Incidencia del cáncer de mama en los ratones de ambos genotipos. Se representa la media \pm error estándar de los porcentajes de cada grupo de ratones que han desarrollado tumores. Las incidencias se compararon mediante el test Mann Whitney (Control n=35; KO n=45).

Los resultados obtenidos en este análisis indican que la deficiencia de $\beta 2$ -quimerina contribuye a la tumorigénesis inducida por ErbB2/Neu en la glándula mamaria, favoreciendo la aparición de tumores a edades más tempranas, aunque no es un factor determinante para la incidencia del cáncer de mama.

2.2 Número de tumores de mama

Cuando se cuantificó el número de tumores de mama por ratón, no se observaron diferencias entre los genotipos, con una media de dos tumores por ratón en ambos casos (Fig. 22A). Al analizar la multiplicidad tumoral, es decir, el porcentaje de ratones que desarrollan 2 o más tumores, observamos que ésta era menor en los ratones KO, con 58,14% de los ratones de este genotipo con dos o más tumores frente al 75,07% de los ratones control (Fig. 22B). No obstante estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Decidimos incrementar el nivel de significación de la multiplicidad, analizando el porcentaje de ratones que desarrollan 3 o más tumores, 4 o más tumores y 6 o más tumores. En este análisis tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de ratones, aunque destacamos que en el grupo con mayor multiplicidad (≥ 6 tumores) sólo se encuentran casos de ratones KO de $\beta 2$ -quimerina (Fig.22B).

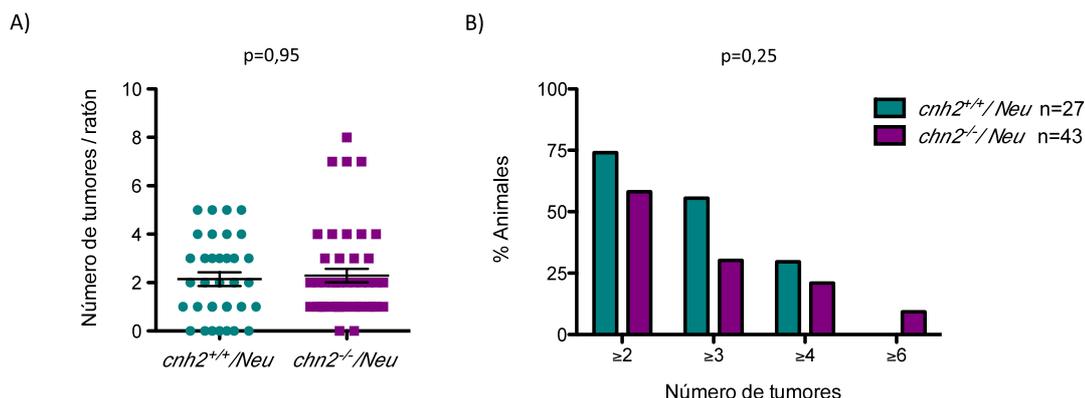


Figura 22. Número de tumores y multiplicidad tumoral. **A)** Representación gráfica del número de tumores por ratón que desarrollan los ratones del grupo control ($chn2^{+/+}/Neu$) y KO de $\beta 2$ -quimerina ($chn2^{-/-}/Neu$). Los datos de ambos genotipos se han comparado utilizando un test de Mann Whitney. **B)** Diagrama de barras donde se representan los porcentajes de las multiplicidades tumorales en los ratones de ambos genotipos. El análisis estadístico se ha realizado mediante test de Chi-cuadrado.

2.3 Volumen tumoral y velocidad de crecimiento

Para determinar la influencia de $\beta 2$ -quimerina en el crecimiento tumoral se evaluaron tres parámetros; el volumen del tumor primario, la carga tumoral total y la velocidad de crecimiento (Fig. 23). Para realizar este análisis, en el momento del sacrificio se cuantificó tanto el volumen de los tumores primarios como la carga tumoral, entendida ésta última como la suma del volumen de todos los tumores presentes en cada ratón (Fig. 23A y B). En este análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones de los dos genotipos ($p = 0,92$ y $p = 0,74$ respectivamente).

Como se explicó anteriormente, el punto final del experimento se estableció en 3 meses desde la aparición del tumor, salvo en los casos en que el diámetro mayor de alguno de los tumores superara los 2 cm. Para evitar que este criterio resultara en un sesgo en el valor del volumen, ya fuese de los tumores primarios o de los secundarios, que estuviera dificultando la interpretación de los resultados, realizamos un segundo análisis en el que se tuvo en consideración el volumen tumoral de cada ratón por día de enfermedad (Fig. 23C). Una vez corregido el volumen de los tumores atendiendo a este criterio, se apreció una mayor diferencia en el volumen total de los tumores entre los ratones de ambos genotipos, siendo el volumen de los tumores de los ratones KO menor que el de los ratones control. No obstante, el análisis estadístico indica que estas diferencias no son significativas ($p = 0,32$).

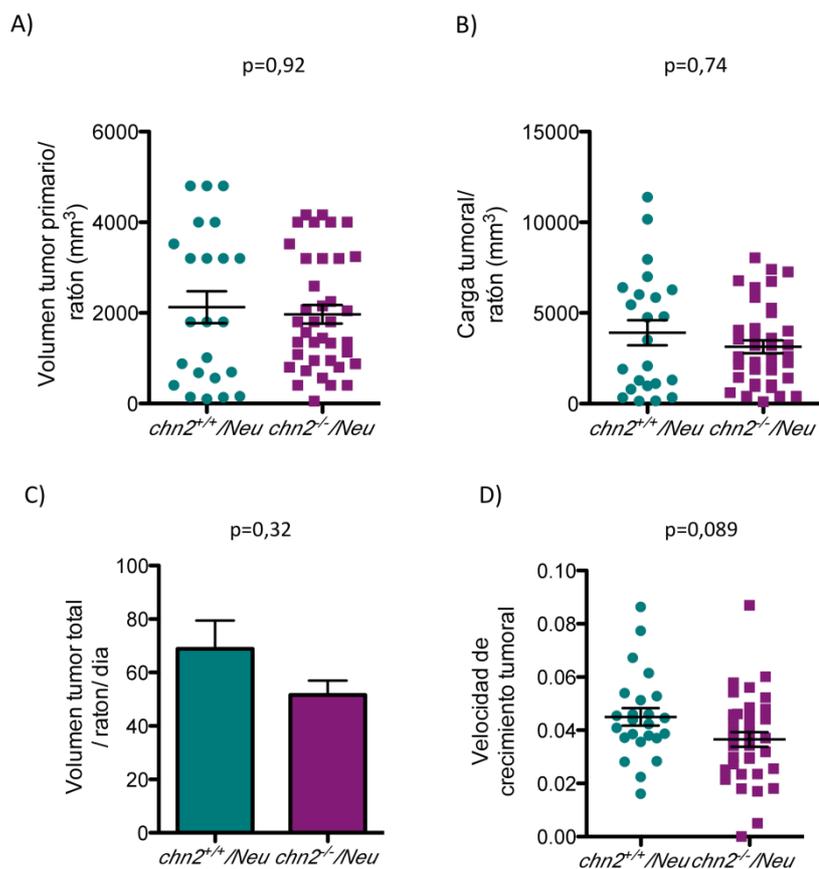


Figura 23. Volumen y velocidad de crecimiento tumoral. **A)** Representación gráfica del volumen del tumor primario de cada ratón de los distintos genotipos (mm³). **B)** Carga tumoral de cada ratón de los distintos genotipos (mm³). **C)** Representación gráfica del promedio del volumen tumoral por día (mm³/día). Se representa la media \pm error estándar. **D)** Velocidad de crecimiento tumoral. En la gráfica se muestran las pendientes correspondientes a las rectas semilogarítmica del volumen del tumor primario de cada ratón durante el tiempo de enfermedad. Los datos de ambos genotipos se han comparado utilizando un test de Mann Whitney. (Control n= 23; KO n= 39)

La velocidad de crecimiento de los tumores fue calculada como la pendiente de la recta obtenida en la representación semilogarítmica de los volúmenes correspondientes a la fase exponencial de crecimiento de los tumores, como se explica en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Como ocurría en el análisis del volumen tumoral, los resultados indican una menor velocidad de crecimiento de los tumores de los ratones KO aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0,089$) (Fig. 23D).

A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas en los análisis descritos en este apartado, el conjunto de estos datos nos sugiere que la eliminación de β 2-quimerina produce un retraso del crecimiento tumoral.

2.4 Evaluación de la presencia de lesiones preneoplásicas

Además de analizar los tumores de mama desarrollados por los ratones de ambos genotipos, en nuestro estudio del papel de $\beta 2$ -quimerina sobre el desarrollo del cáncer de mama se evaluaron las mamas no afectadas por la presencia de tumores palpables en aquellos animales que desarrollaron la enfermedad. Para este análisis, las mamas no afectadas por tumores se recogieron, se fijaron en portaobjetos y se tiñeron con alumbre carmín como se indica en la sección correspondiente de Materiales y Métodos, cuantificándose posteriormente las lesiones encontradas en cada genotipo (Fig. 24).

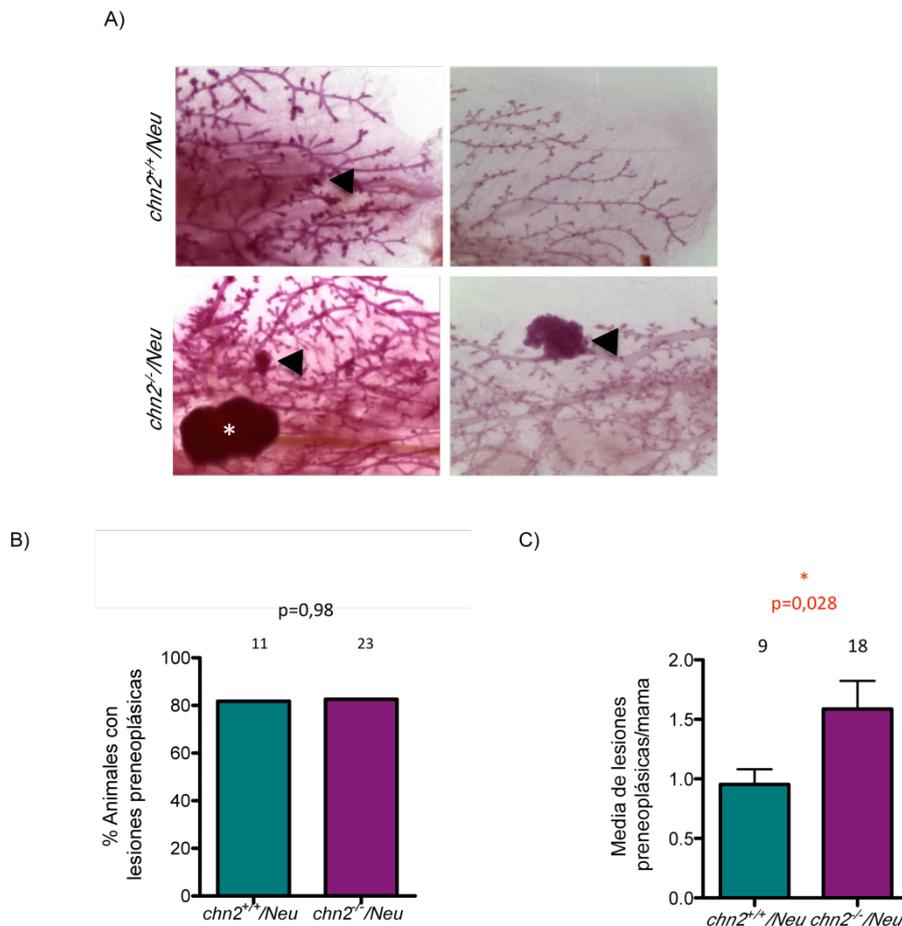


Figura 24. Análisis de la lesiones preneoplásicas. **A)** Imágenes representativas de las glándulas mamarias no afectadas por tumores en los ratones de ambos genotipos teñidas con Alumbre Carmín. Las flechas indican las lesiones preneoplásicas. El asterisco indica el nódulo linfático presente en las glándulas inguinales. **B)** Incidencia de lesiones preneoplásicas (Control n=11; KO n=23). **C)** Representación gráfica de la media de lesiones preneoplásicas por mama analizada. Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante test de Mann Whitney (Control n=9; KO n=18).

La incidencia de lesiones preneoplásicas fue similar en los ratones de ambos genotipos puesto que un 80% de los ratones tanto control como KO para β 2-quimerina presentaban este tipo de lesiones (Fig. 24B). Sin embargo, cuando se cuantificó la media de lesiones presentes por mama observamos que los ratones KO tenían mayor número de lesiones preneoplásicas que los ratones control ($1,58 \pm 0,23$ vs. $0,95 \pm 0,12$ respectivamente, $p = 0,028$) (Fig. 24C).

Los datos obtenidos en este análisis sugieren que la deficiencia de β 2-quimerina afecta a la fase inicial de la oncogénesis, pues favorece el incremento de las lesiones preneoplásicas, lo que en último término se traduciría en un mayor número de tumores de mama por individuo.

2.5 Análisis histopatológico de tumores de mama

Para profundizar en el estudio del papel de β 2-quimerina en el proceso tumorigénico se evaluaron las características histopatológicas de los tumores de mama primarios procedentes de los animales control y KO (Fig. 25). En el momento de la realización de la necropsia se observaron diferencias macroscópicas en los tumores desarrollados por los ratones de ambos genotipos. En la mayor parte de los ratones control, los tumores presentaban grandes acumulaciones de sangre que eran poco frecuentes en el caso de los tumores de los ratones KO (Fig. 25A). Las muestras de los tumores se incluyeron en parafina y se tiñeron con H&E para evaluar el grado histológico mediante su clasificación siguiendo el método de Elston y Ellis, como se indica en Materiales y Métodos. La mayor parte de los tumores procedentes de los ratones control correspondían a carcinomas de grado III (94 % de los casos), mientras que solamente el 52% de los tumores de los ratones KO presentaban este grado histológico. El 45% de los tumores de los ratones KO se engloban dentro del grado II frente al 6% de los tumores de ratones control clasificados en este grupo. Además, los únicos tumores de grado I pertenecían al grupo de los ratones KO (Fig. 25B). Estas diferencias en el grado histológico fueron estadísticamente significativas y sugieren una correlación entre la ausencia de β 2-quimerina y un fenotipo de menos agresivo ($p = 0,015$).

Además del grado histológico, se evaluó la presencia de cambios degenerativos en los tumores, entendidos éstos como la progresión desde la aparición de zonas hemorrágicas a la presencia de zonas de necrosis y la degeneración quística. Este análisis mostró una menor incidencia de dichos cambios degenerativos en el grupo de los ratones KO (Fig. 25C). La presencia de zonas hemorrágicas en los tumores fue significativamente inferior ($p = 0,03$) en ausencia de β 2-quimerina (Fig. 25D). Además, cuando se clasificaron los tumores según el grado de necrosis se observan diferencias significativas ($p=0,022$), con menor proporción de tumores con alto grado de necrosis en los ratones KO (Fig. 25E).

Resultados

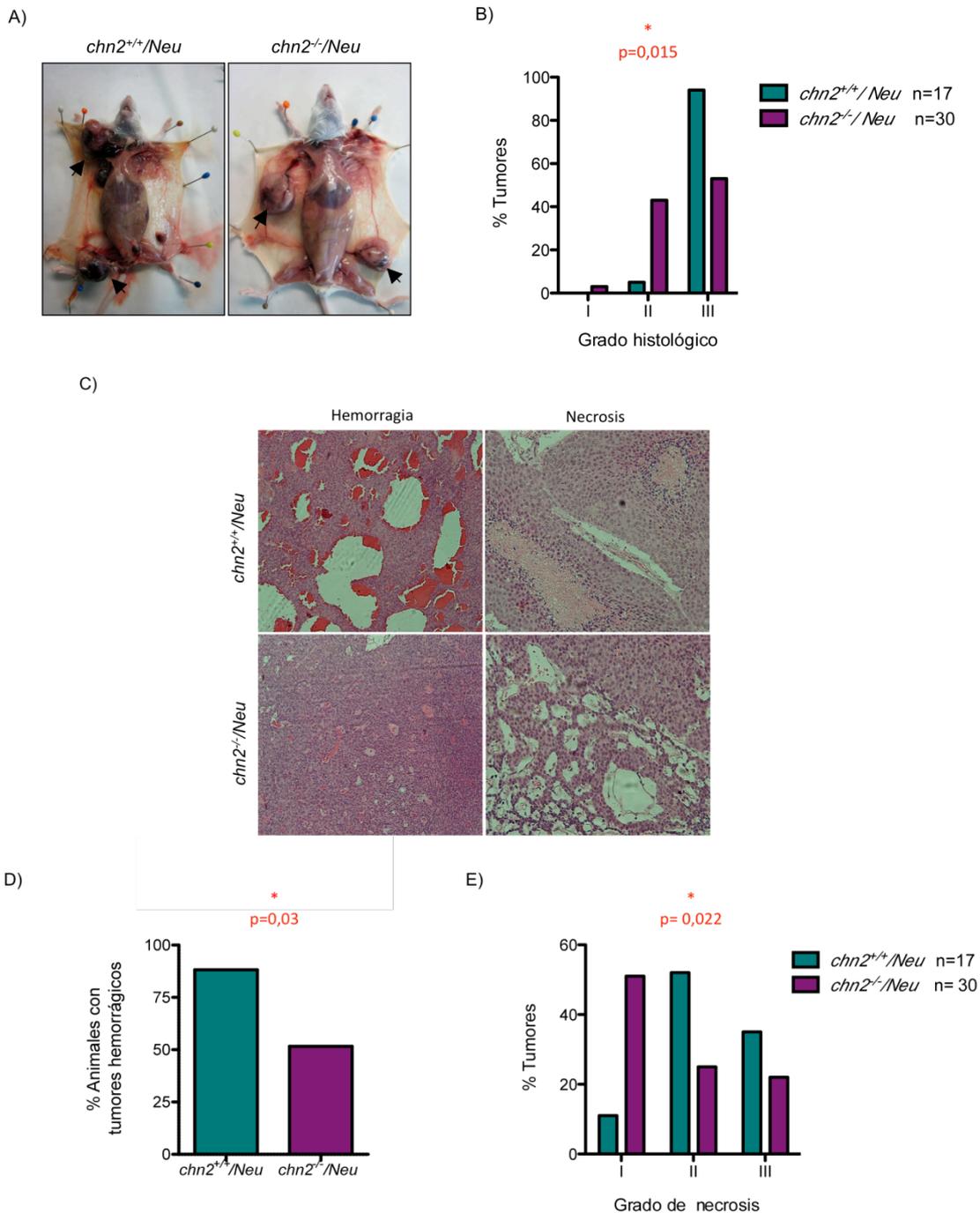


Figura 25. Análisis histopatológico de los tumores de mama. A) Imagen representativa de dos ratones de los genotipos indicados tras la necropsia. Las flechas indican los tumores de mama. **B)** Grado histológico de los tumores de los ratones de cada genotipo. **C)** Tinción H&E de tumores del genotipo control y KO mostrando los cambios degenerativos. Paneles de la izquierda: imágenes representativas de la presencia de zonas hemorrágicas (10x). Paneles de la derecha imágenes representativas de los diferentes grados de necrosis; grado III (superior) y grado II (inferior) (20x). **D)** Representación gráfica del porcentaje de tumores de cada genotipo con presencia de zonas hemorrágicas. Datos comparados mediante test de Mann Whitney. **E)** Representación gráfica de los porcentajes de tumores clasificados en los diferentes grados de necrosis. Datos comparados mediante test de Chi cuadrado

En conjunto, los resultados del análisis histopatológico indican que la deficiencia de $\beta 2$ -quimerina favorece el desarrollo de tumores de menor grado histológico y previene frente a los cambios degenerativos y necrosis tumoral asociados con tumores más agresivos.

2.6 Análisis de la proliferación de las células tumorales

Teniendo en cuenta que uno de los procesos implicados en la fase inicial del cáncer de mama y en el crecimiento tumoral es la proliferación celular, se comenzó con el análisis de este proceso en los tumores de ambas poblaciones, control y KO para $\beta 2$ -quimerina. La proliferación se cuantificó mediante inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo anti-Ki67 que permite la detección de los núcleos de las células que se encuentran en división (Fig. 26A).

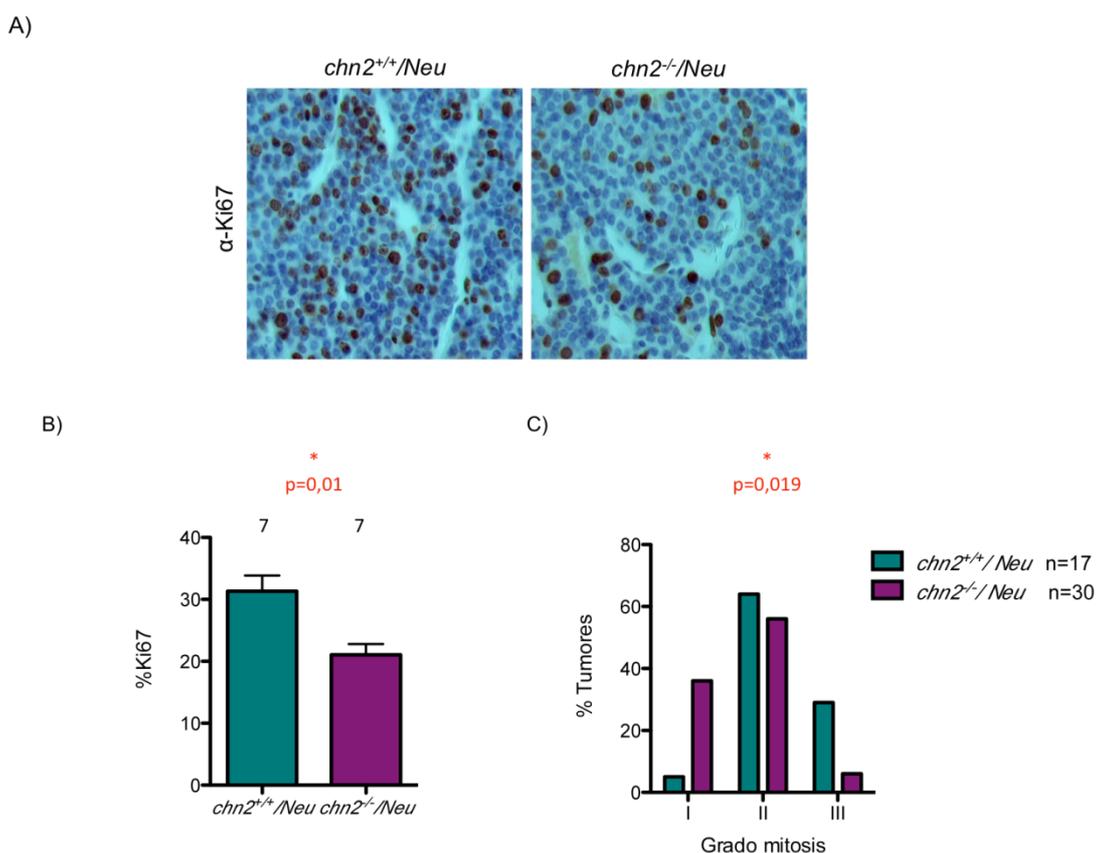


Figura 26. Proliferación y grado de mitosis de los tumores de mama. A) Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica frente a Ki67 de los genotipos control y KO. **B)** Representación gráfica de las proporciones de células positivas para Ki67 (Control n= 7; KO n=7). Los valores muestran la media \pm error estándar. Datos comparados por test de Mann-Whitney. **C)** Representación gráfica de las proporciones tumorales de cada genotipo según su grado el grado de mitosis. Datos comparados por test Chi cuadrado.

Para la cuantificación de la proliferación se contaron las células positivas para Ki67 en 10 campos a gran aumento (40x) y se calculó el porcentaje que éstas representaban frente al total de cada sección. Este estudio mostró una diferencia significativa en la tasa de proliferación celular dependiente del genotipo ($p = 0,01$), pues los tumores analizados del grupo de los ratones control mostró un porcentaje medio de células positivas para Ki67 del $31,33 \pm 2,5\%$ frente al $21,6 \pm 1,7\%$ de los ratones KO (Fig. 26B). Datos similares se obtuvieron cuando se evaluó el índice mitótico en las tinciones de H&E de los tumores. En este caso se cuantificó el número de células en mitosis en 10 campos a gran aumento (40x) y se clasificaron los tumores en grado I (≤ 5 mitosis), grado II (> 5 mitosis y < 10) y grado III (≥ 10 mitosis). Atendiendo a esta clasificación, se observaron diferencias llamativas en las distribuciones encontradas en función del genotipo entre los diferentes grados, especialmente entre el I y III. El grado I de mitosis contaba con tan sólo el 5% de los tumores control frente al 36% de los tumores deficientes en $\beta 2$ -quimerina. Por el contrario el grado III muestra una distribución opuesta, con el 29% de los tumores control frente al 6% de los KO (Fig. 26C). Este análisis puso de manifiesto una disminución estadísticamente significativa de células en mitosis en ausencia de la $\beta 2$ -quimerina ($p = 0,019$).

El conjunto de los datos obtenidos del análisis de la proliferación celular en el tejido tumoral de los ratones de los dos genotipos analizados muestran que, en contra de lo esperado, la deficiencia de $\beta 2$ -quimerina podría estar previniendo frente al aumento de la división celular y por tanto retrasando la progresión de la patología. Además esta tasa menor de proliferación en los tumores de los ratones KO de $\beta 2$ -quimerina explicaría los fenotipos observados de volumen y velocidad de crecimiento tumoral analizados anteriormente.

2.7 Análisis de la apoptosis tumoral

La apoptosis se trata de un mecanismo de muerte celular muy controlado que las células son capaces de inducir en cualquier momento del ciclo celular en el caso de que detecten anomalías genómicas que no puedan ser reparadas. Es por ello que se considera un mecanismo protector frente a la transformación maligna, por lo que su análisis es fundamental en el estudio del cáncer de mama.

La proteína Rac, como se ha comentado anteriormente puede regular los procesos de supervivencia celular y apoptosis, por lo que evaluamos el efecto de la eliminación de $\beta 2$ -quimerina en la muerte celular por apoptosis de las células tumorales. Para realizar el análisis comparamos los niveles de expresión de caspasa-3 activada (Caspase-3 *cleaved*, en inglés) en tumores procedentes de animales control y KO mediante tinción inmunohistoquímica y western-blot. La proteína caspasa-3 es utilizada como marcador de apoptosis, ya que su actividad es esencial en este proceso de muerte celular controlada.

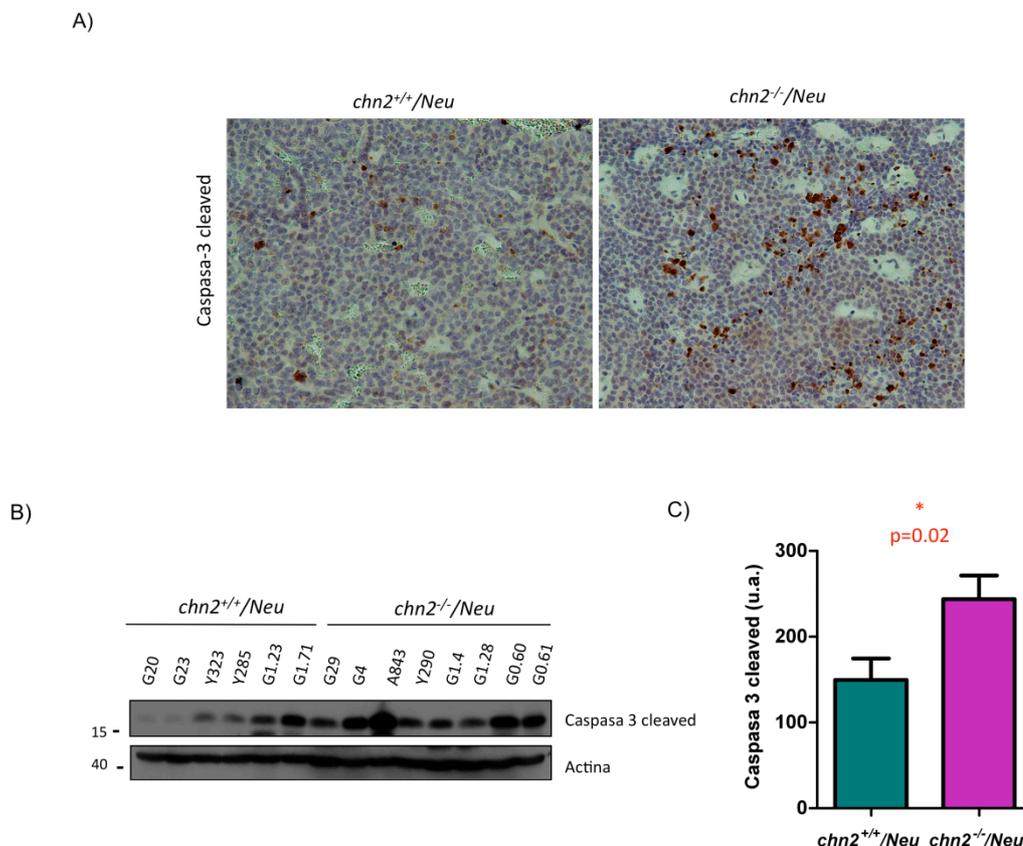


Figura 27. Evaluación de la apoptosis en los tumores de mama. A) Imagen de la tinción inmunohistoquímica frente a caspasa-3 *cleaved* representativa de los genotipos control y KO. **B)** Western blot de la expresión de proteínas de apoptosis en tejido de tumor de mama. Panel superior: expresión de caspasa-3 *cleaved*. Panel inferior: niveles de actina. Niveles de proteínas detectados mediante western blot e inmunodetección con los anticuerpos correspondientes. **C)** Cuantificación del nivel de expresión de caspasa-3 *cleaved* respecto a los niveles de expresión de actina. Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante el test de Mann Whitney (Control n = 6; KO n=8).

La evaluación de la muerte celular mediante tinción inmunohistoquímica muestra mayor número de células positivas frente al marcaje con caspasa-3 *cleaved* en las secciones de tumores procedentes de animales KO de β 2-quimerina indicando un mayor porcentaje de apoptosis (Fig. 27A). Además, estos resultados, evidentes por microscopía, se corroboraron por el análisis de los niveles de caspasa-3 activada detectados en los lisados tumorales por Western blot (Fig. 27B). La cuantificación de los niveles de expresión de esta proteína mostró la mayor activación de caspasa-3 en ausencia de β 2-quimerina ($p=0,02$) (Fig. 27C). Estos resultados indican que la inactivación de β 2-quimerina en los tumores de mama favorece la apoptosis.

2.8 Evaluación de la angiogénesis tumoral

La angiogénesis es uno de los procesos limitantes para el desarrollo y progresión tumoral, pues permite el aporte de nutrientes necesario para el crecimiento de las células tumorales, por medio de la formación de vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Teniendo en cuenta que habíamos observado el desarrollo de tumores de mayor volumen y con mayor velocidad de crecimiento en los ratones control, donde se expresa $\beta 2$ -quimerina, y puesto que previamente habíamos observado también un incremento de necrosis tumoral en ese mismo genotipo, se analizó el grado de angiogénesis como posible factor determinante del fenotipo observado (Fig. 28).

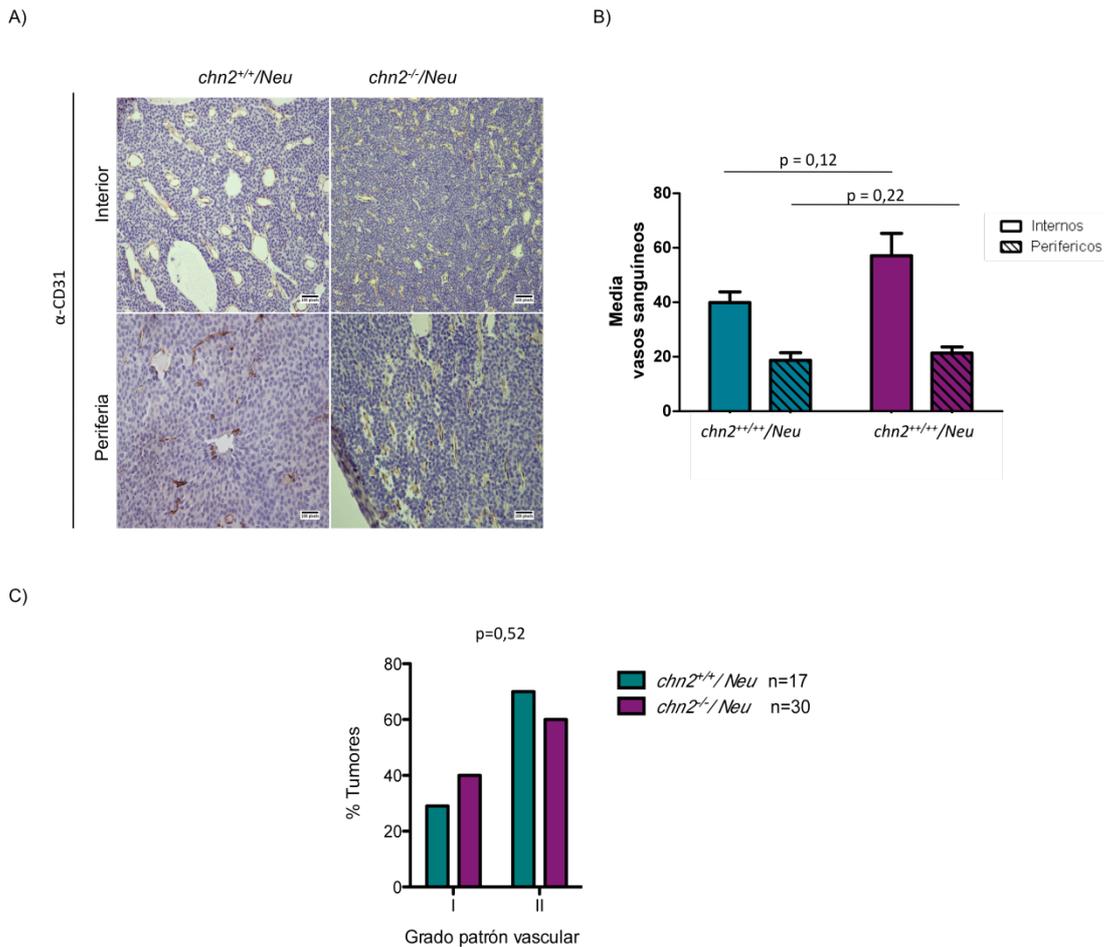


Figura 28. Angiogénesis y patrón vascular de los tumores de mama. A) Imagen de la tinción inmunohistoquímica frente a CD31 representativa de los genotipos control y KO. Paneles superiores: Imagen representativa de la tinción en el interior del tejido tumoral (10x). Paneles Inferiores: Imagen representativa de la tinción en la periferia del tejido tumoral (20x). **B)** Representación gráfica de las proporciones de células positivas para CD31 tanto en la periferia como en el interior del tejido tumoral. Los valores muestran la media \pm error estándar. Datos comparados por test Mann Whitney (Control n=7; KO n=7). **C)** Representación gráfica de las proporciones tumorales de cada genotipo según su grado del patrón vascular. Datos comparados por test Chi cuadrado (Control n=17; KO n=30).

Para estudiar la angiogénesis se procedió a la evaluación histopatológica de la tinción inmunohistoquímica realizada con el anticuerpo anti-CD31, marcador permite detectar las células endoteliales presentes en el tumor (Fig. 28A). Para comprobar si existían diferencias la vascularización, se determinó el número de capilares presentes por mm^2 en muestras de tumores de los ratones de los dos genotipos analizados. Para ello se cuantificaron los capilares detectados mediante la tinción inmunohistoquímica con anti-CD31. En la cuantificación se valoró la media de vasos sanguíneos presentes en 4 campos de gran aumento, tanto en zonas internas como periféricas de los tumores (Fig. 28A). El resultado de este análisis mostró valores semejantes en cuanto al número de vasos sanguíneos en ambos casos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (Fig. 28B).

De forma complementaria a este estudio, se determinó por un patólogo experto el grado del patrón vascular mediante la evaluación de los cortes de los tumores teñidos con H&E. Este análisis tampoco reveló diferencias significativas, aunque los ratones KO desarrollaban un mayor porcentaje de tumores con un fenotipo vascular de grado I, que corresponde a la presencia de capilares ramificados con paredes finas entremezclados con los vasos sanguíneos normales (Fig. 28C).

En conjunto, los datos obtenidos del análisis del desarrollo y evolución del cáncer de mama en ratones MMTV/Neu sugieren que el fenotipo tumoral resultante de la eliminación de $\beta 2$ -quimerina en este modelo en es general menos agresivo. Los resultados muestran que estos tumores tienen un grado histológico menor, con menor necrosis. Al mismo tiempo, la disminución de la proliferación y la mayor apoptosis observados estarían relacionados con el crecimiento tumoral ralentizado previamente descrito en los ratones deficientes en $\beta 2$ -quimerina.

3. Relación entre la expresión de $\beta 2$ -quimerina y metástasis pulmonar

La metástasis es el proceso que sucede en la etapa final de la tumorigénesis y se produce cuando las células tumorales, tras haber sufrido una serie progresiva de alteraciones, se transforman desde el fenotipo inicial, generalmente epitelial, hasta el final, mesenquimal e invasivo. Teniendo en cuenta que el tipo de cáncer de mama en ratones MMTV/Neu sólo metastatiza a pulmón, se analizó la metástasis únicamente en este órgano. Para llevar a cabo este estudio se realizaron cortes seriados de los pulmones enteros procedentes de ratones que habían desarrollado tumores de mama, se tiñeron con H&E y se contabilizaron los impactos metastásicos (Fig. 29). El porcentaje de ratones del grupo control con metástasis pulmonar fue del 66,7%, similar al descrito en este modelo de ratón, mientras que en los ratones del grupo KO fue del 40%, es decir, menos de la mitad de los ratones que desarrollan tumores presentan metástasis en los pulmones (Fig. 29B). Estos datos sugieren que, en contra de lo esperado, la

Resultados

eliminación de $\beta 2$ -quimerina reduce la susceptibilidad a desarrollar metástasis. Este comportamiento podría deberse, entre otros factores, a una menor capacidad de dediferenciación desde el fenotipo epitelial al mesenquimal de las células tumorales de los ratones KO.

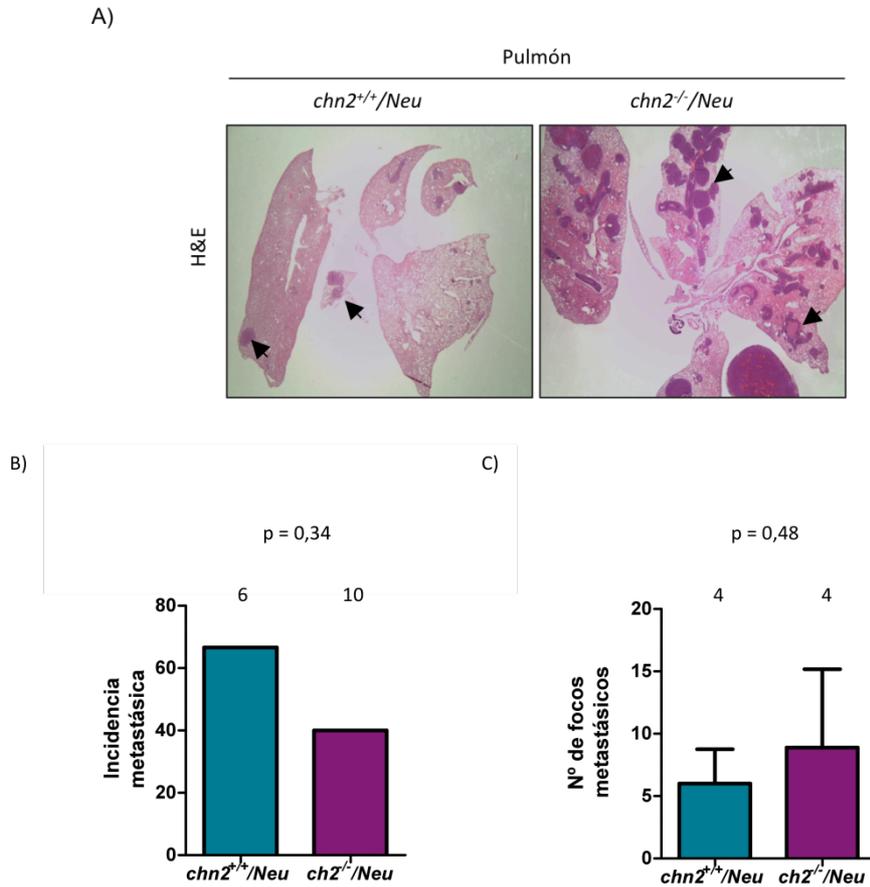


Figura 29. Incidencia y media de focos metastásicos pulmonares. **A)** Tinción de H&E representativa de secciones de pulmón de ambos genotipos. Las flechas indican focos metastásicos. **B)** Representativa gráfica de la incidencia de focos metastásicos en ambos genotipos (Control n=6; KO n=10). **C)** Representación gráfica de la distribución del número de impactos metastásicos por pulmón de cada uno de los grupos de ratones. Los valores representan la media \pm error estándar. Los datos se compararon mediante el test Mann Whitney (Control n=4; KO n=4).

Cuando se analizó el número de metástasis pulmonares por ratón, dentro de los animales con metástasis, observamos que el grupo de ratones KO presentaba mayor número de impactos metastásicos por pulmón que el grupo de ratones control ($6 \pm 2,75$ vs. $8,9 \pm 6,28$) (Fig. 29C). Este dato sugiere que en ausencia de $\beta 2$ -quimerina, las células tumorales que hayan logrado alcanzar la EMT tendrían mayor capacidad de migración y potencial invasivo, pese a ser menos susceptibles a dicha dediferenciación. No obstante, aunque las diferencias tanto en la incidencia como en la multiplicidad de la metástasis son llamativas no fueron estadísticamente significativas debido al bajo número de

individuos analizados. Se está completando el estudio en la actualidad para corroborar estos resultados.

4. Análisis del papel de β 2-quimerina en las rutas de señalización implicadas en el cáncer de mama

4.1 Activación de Rac

Para conocer el impacto de β 2-quimerina en las diferentes rutas de señalización reguladas por Rac que son relevantes en el desarrollo del cáncer de mama, evaluamos en primer lugar los niveles de activación de Rac en los tumores de mama de los ratones control y KO. Previamente a este estudio corroboramos que β 2-quimerina se expresa en los tumores de mama procedentes de los ratones control, mientras que no detectamos la expresión de esta proteína en los ratones KO (Fig. 30A). Para cuantificar los niveles de RacGTP presentes en las muestras tumorales realizamos ensayos de *pull down* como se describió en Materiales y Métodos (Fig. 30B).

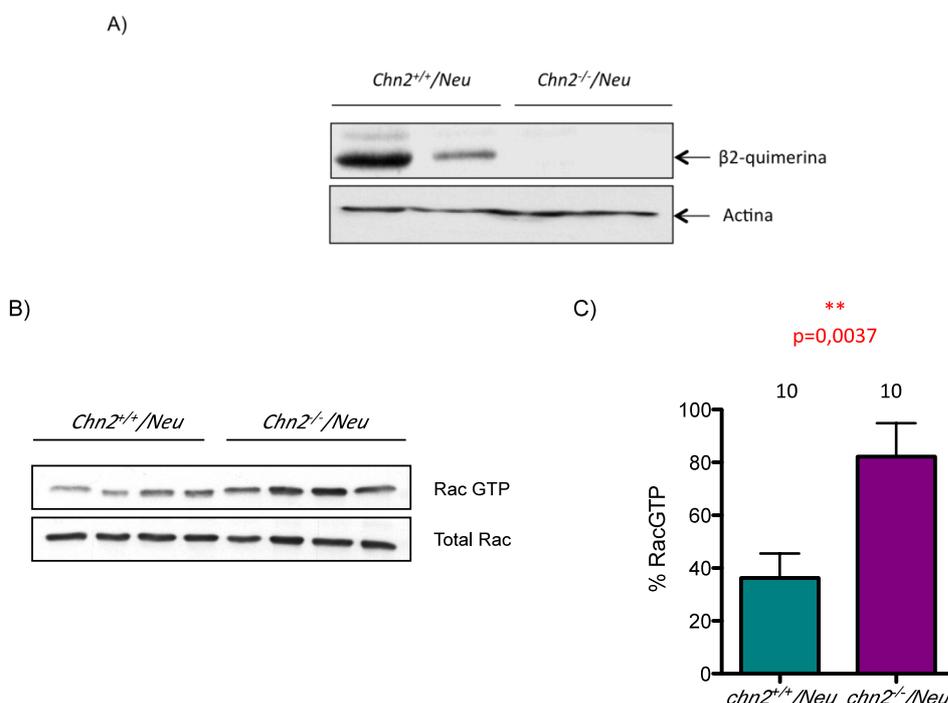


Figura 30. Actividad GAP de β 2-quimerina en los tumores de mama. **A)** Análisis mediante western blot de los niveles de expresión de β 2-quimerina en tejido de tumor de mama en ratones control y KO. **B)** Ensayo de pull-down representativo para determinar los niveles de Rac activado en tumores de los genotipos indicados. Panel superior: niveles de RacGTP. Panel inferior: niveles de Rac totales. Los niveles de Rac se determinaron mediante western blot e inmunodetección con anti-Rac. **C)** Densitometría de la cantidad de RacGTP respecto a la cantidad de Rac para cada una de las muestras. Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante el test de Mann Whitney (Control n=10; KO n=10)

Como se observa la figura, los niveles de Rac activo fueron significativamente mayores en el caso de las muestras tumorales de los ratones KO frente a las de los ratones control ($p = 0,003$) (Fig. 30C), demostrando el papel de $\beta 2$ -quimerina en la regulación de la activación de Rac en estos tejidos.

Dadas las diferencias en el nivel de RacGTP de los tejidos tumorales, se prosiguió al estudio de las diferentes moléculas que participan o pueden verse afectadas por el cambio en la actividad de Rac y que participan en la progresión del cáncer de mama. En un primer análisis se estudiaron los tejidos tumorales en la fase tardía del desarrollo tumoral, tres meses de enfermedad, es decir, tumores a los cuales se les había permitido su desarrollo el tiempo máximo que establecía nuestro criterio.

4.2 Evaluación de la activación de AKT y ERK

El modelo de ratón MMTV/Neu, se caracteriza por la sobreactivación de las rutas de PI3K/AKT y ERK en tumores de mama debido a la sobreexpresión del receptor ErbB2/Neu. Ambas rutas regulan funciones fundamentales para el desarrollo y progresión del cáncer de mama como son la supervivencia celular en el caso de AKT y la proliferación en el de ERK. Además, ambas rutas pueden estar reguladas la actividad de Rac. Es por tanto, que decidimos analizar el impacto de la eliminación de $\beta 2$ -quimerina en la activación de ambas proteínas en los tumores de los ratones KO. Con este fin, se analizó por western blot los niveles de AKT y ERK1/2 fosforilados en lisados de los tumores procedentes de los ratones de los dos genotipos estudiados (Fig. 31).

En la figura 31A se muestran los niveles de fosforilación de AKT y de ERK, así como la expresión total de estas proteínas, en 11 ratones del grupo control y 12 ratones KO. Como se puede observar, existen variaciones en la fosforilación de estas proteínas entre individuos de cada genotipo. Para comprobar si existían diferencias dependientes de la expresión de $\beta 2$ -quimerina, se procedió a la cuantificación de la fosforilación de AKT y de ERK respecto a la cantidad total de las proteínas correspondientes. No se apreciaron diferencias significativas entre los tumores de los ratones control y KO en los niveles de fosforilación de AKT ni de ERK (Fig. 31B y C respectivamente). No t, a pesar de que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, en ambos casos se observa una tendencia a una mayor fosforilación de estas proteínas en las muestras tumorales de los ratones KO.

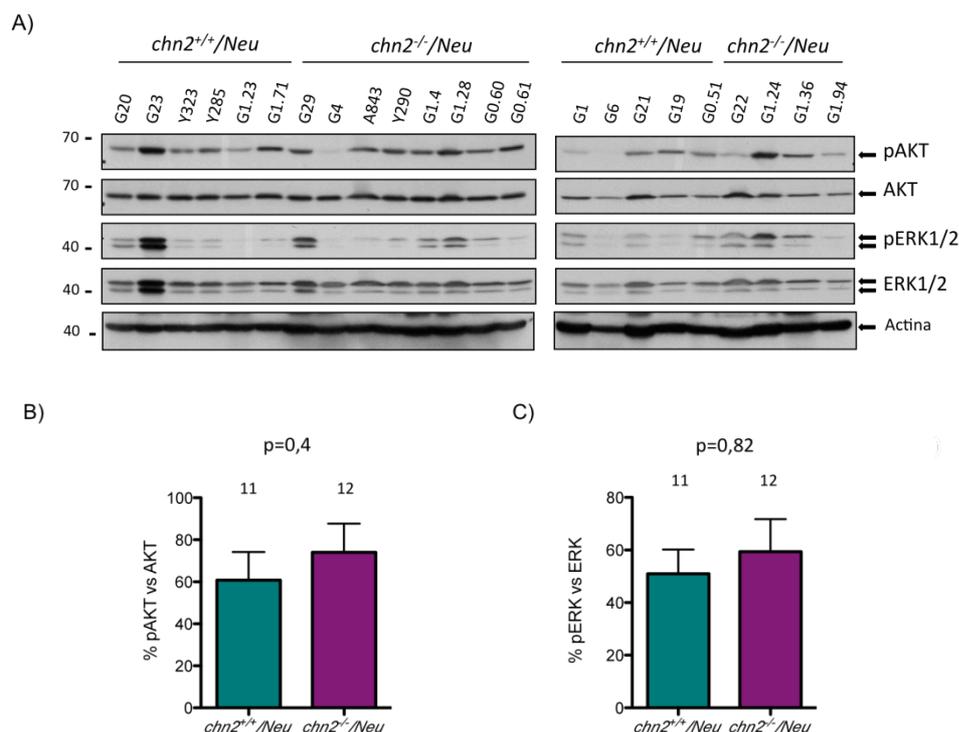


Figura 31. Niveles de fosforilación de AKT y ERK en tumores de mama **A)** Western blot de la activación de las rutas AKT y ERK en tejido de tumor de mama. Paneles superiores: niveles de pAKT y totales de AKT. Paneles intermedios: niveles de pERK1/2 y totales de ERK1/2. Panel inferior: niveles actina. Los niveles de las diferentes proteínas fueron detectados mediante western blot e inmunodetección con los anticuerpos correspondientes. **B)** Cuantificación del nivel de pAKT respecto a la cantidad total de AKT **C)** Cuantificación del nivel de pERK respecto a la cantidad total de ERK. **B)** y **C)** Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante el test de Mann Whitney (Control n=11; KO n=12).

4.3 Evaluación de la expresión de ciclina D1

Como ya se ha explicado en la introducción, existen evidencias que demuestran la correlación entre la reducción de los niveles de Rac activo mediada por la actividad catalítica de $\beta 2$ -quimerina y una menor proliferación celular como consecuencia de la disminución del nivel de expresión de la ciclina D1. Además, se sabe que la expresión de ciclina D1 puede ser estimulada por Rac, ya sea a través de la activación de ERK, como a través de la inducción de contactos intercelulares mediados por E-cadherina o por integrinas. Por último, en los ratones MMTV/Neu es frecuente la sobreexpresión de ciclina D1 debido en parte a la activación de las rutas de Ras y Rac por ErbB2. La sobreexpresión de esta ciclina juega un papel esencial en la patogénesis molecular del cáncer de mama, contribuyendo a la proliferación descontrolada de las células tumorales. Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos comprobar si la eliminación de $\beta 2$ -quimerina en los ratones MMTV/Neu afectaba a la expresión de ciclina D1 (Fig. 32).

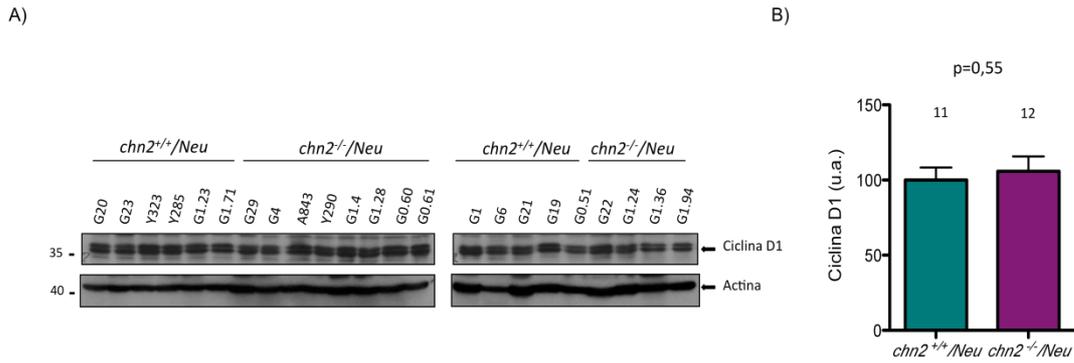


Figura 32. Niveles de expresión de ciclina D1 en tumores de mama. A) Western blot de la expresión de ciclina D1 en tejido de tumor de mama. Panel superior: expresión de ciclina D1. Panel inferior: niveles control de actina. Niveles detectados mediante western blot e inmunodetección con anti-ciclina D1. **B)** Cuantificación del nivel de expresión de ciclina D1 respecto a los niveles de expresión de actina. Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante el test de Mann Whitney (Control n=11; KO n=12).

El análisis mediante Western blot de los niveles de expresión de ciclina D1 en los tumores de los ratones KO y control no reflejó diferencias estadísticamente significativas entre ambos genotipos (Fig. 32). En este caso, los niveles de ciclina D1 son prácticamente similares en las muestras tumorales tanto de ratones control como KO para β 2-quimerina, lo que hace suponer que la desregulación de Rac debido a la eliminación de β 2-quimerina en estos tumores no repercute en los niveles de ciclina D1.

4.4 Análisis de la expresión de E-cadherina y β -catenina

Durante la progresión tumoral, la desdiferenciación celular, en concreto la pérdida de contactos celulares, es un acontecimiento esencial que determina en muchos casos la evolución del tumor hacia un fenotipo invasivo. Las AJ son las uniones intercelulares formadas principalmente por las proteínas E-cadherina y β -catenina. Estas adhesiones se caracterizan por encontrarse conectadas con el citoesqueleto de actina, por lo que son susceptibles de ser reguladas por Rac. Por otra parte, se ha descrito la relación existente entre la expresión de β 2-quimerina y la formación de AJ. Es por ello que se evaluó en qué medida se afectaban las proteínas más relevantes de las AJ por la eliminación de la expresión de β 2-quimerina.

En primer lugar, se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión y la distribución celular de E-cadherina en secciones de los tumores de los ratones control y KO (Fig. 33A). Como se refleja en la figura no se aprecian diferencias ni en la localización ni en la expresión de la E-cadherina entre los tumores de ambos genotipos.

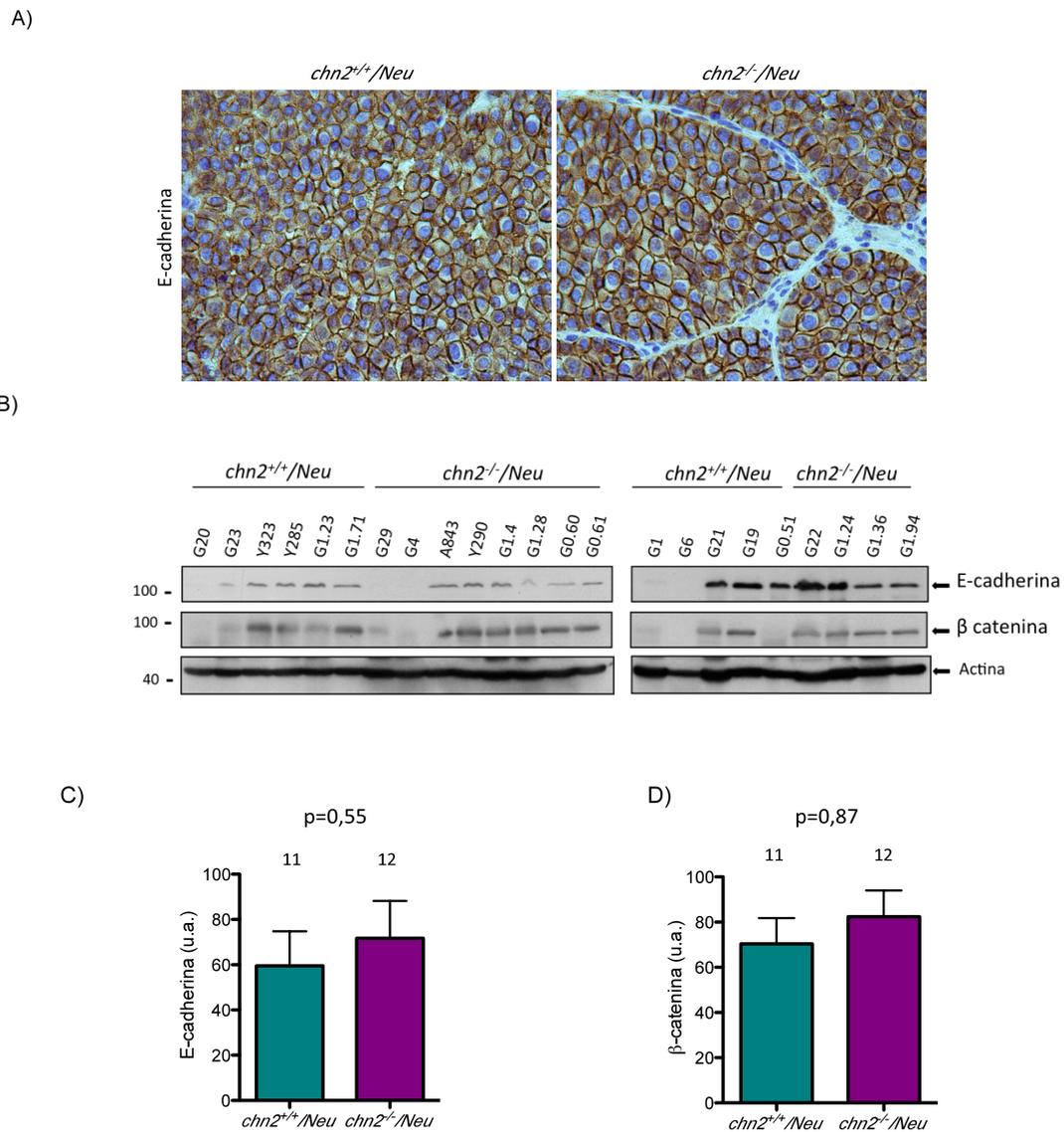


Figura 33. Expresión de E-cadherina y β -catenina. **A)** Imagen de la tinción inmunohistoquímica frente a E-cadherina representativa de los genotipos control y KO. **B)** Western blot de la expresión de proteínas de adhesión en tejido de tumor de mama. Panel superior: expresión de E-cadherina. Panel intermedio: expresión de β -catenina. Panel inferior: expresión de actina. Los niveles de las diferentes proteínas fueron detectados mediante western blot e inmunodetección con los anticuerpos correspondientes. **C)** y **D)** Cuantificación del nivel de expresión de E-cadherina y β -catenina respecto a los niveles de expresión de actina. Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante el test de Mann Whitney (Control n=11; KO n=12).

Con la intención de profundizar en este estudio se cuantificaron los niveles de expresión de E-cadherina y β -catenina, mediante western blot (Fig. 33B). Los niveles de expresión de las dos proteínas fueron superiores en los tumores de los ratones KO, lo que podría indicar un refuerzo de las AJ en los tumores deficientes en β 2-quimerina. No obstante las diferencias en la expresión de ambas proteínas

no fueron muy llamativas y no alcanzaron significación estadística ($p=0,55$ y $0,87$ respectivamente) (Fig. 33C y 33D). Estos datos sugieren un efecto mínimo de $\beta 2$ -quimerina en la expresión de dichas proteínas, al menos en la fase más avanzada de los tumores de mama utilizados para este estudio, es decir, aquellos que se desarrollaron durante aproximadamente 3 meses de enfermedad.

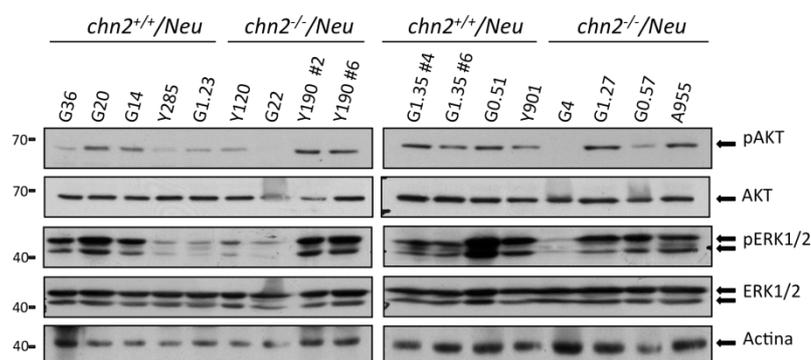
5. Análisis del papel de $\beta 2$ -quimerina en las rutas de señalización mediadas por ErbB2/Neu en la fase temprana de la enfermedad

Llegados a este punto y teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, de entre los cuales destaca un tiempo de latencia marcadamente menor en los tumores de mama de los ratones KO de $\beta 2$ -quimerina, pero sin diferencias significativas a nivel molecular, nos planteamos la posibilidad de que quizás se pudieran poner de manifiesto estos cambios moleculares en una fase más temprana de la enfermedad.

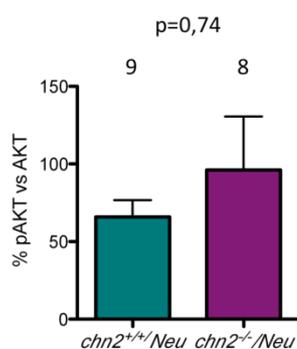
Dado que para el estudio anterior se habían seleccionado los tumores que se encontraban en la fase más avanzada de la enfermedad, para este nuevo estudio se utilizaron tumores obtenidos tras 1 mes de evolución de la enfermedad y se procedió a realizar un estudio bioquímico similar al realizado en tumores de 3 meses.

En primer lugar se estudiaron los niveles de fosforilación de AKT y ERK1/2, proteínas que, como se ha mencionado anteriormente, regulan rutas relacionadas con la supervivencia celular y proliferación respectivamente. En la figura 34 se muestran los resultados del análisis de estas proteínas por western blot y la cuantificación correspondiente. En el caso de AKT, los niveles de proteína fosforilada fueron superiores en los tumores procedentes de ratones deficientes en $\beta 2$ -quimerina, como ocurría en las muestras tumorales de la fase tardía, con la peculiaridad de que las diferencias en esta fase temprana parecen estar algo más marcadas (Fig.34B). Sin embargo, los tumores en la fase temprana del desarrollo tumoral presentaban un patrón de activación de ERK1/2 opuesto al observado previamente. Las muestras tumorales de los ratones KO de $\beta 2$ -quimerina mostraban unos niveles de fosforilación de ERK reducidos en comparación con las muestras control (Fig. 34C). En cualquier caso, las diferencias tanto en la fosforilación de AKT como de ERK no fueron estadísticamente significativas, como ya había ocurrido en el análisis previo, indicando una repercusión escasa o nula de $\beta 2$ -quimerina en la activación de estas proteínas en este modelo.

A)



B)



C)

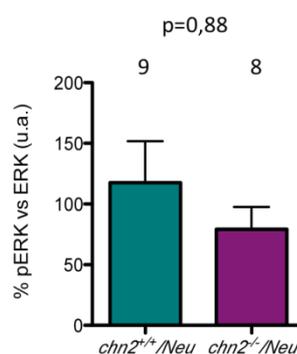


Figura 34. Niveles de fosforilación de AKT y ERK en tumores de mama de 1 mes. A) Western blot de la activación de las rutas AKT y ERK1/2 en tejido de tumor de mama. Paneles superiores: niveles de pAKT y totales de AKT. Paneles intermedios: niveles de pERK1/2 y totales de ERK1/2. Panel inferior: expresión de actina. Los niveles de las diferentes proteínas fueron detectados mediante western blot e inmunodetección con los anticuerpos correspondientes. **B)** y **C)** Cuantificación del nivel de fosforilación de pAKT y pERK1/2 (primer y tercer panel, A) respecto a la cantidad total de AKT y ERK1/2 (segundo y cuarto panel, A), para cada una de las muestras. Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante el test de Mann Whitney (Control n=9; KO n=8).

La sobreexpresión de la ciclina D1 es en parte responsable de la hiperproliferación de los tumores de mama en los ratones MMTV/Neu y por tanto los niveles de esta proteína pueden ser más relevantes en las fases iniciales de la transformación maligna. El análisis de los niveles de esta proteína en tumores de 1 mes, que se encontraban en la fase exponencial del crecimiento tumoral, reveló un ligero aumento en el caso de los tumores deficientes en β 2-quimerina, lo que apoyaría un fenotipo tumoral con proliferación levemente favorecida (Fig. 35). No obstante, como ocurría en los tumores analizados en la fase tardía, las diferencias encontradas al comparar ambos genotipos no eran significativas desde el punto de vista estadístico ($p = 0,32$).

Resultados

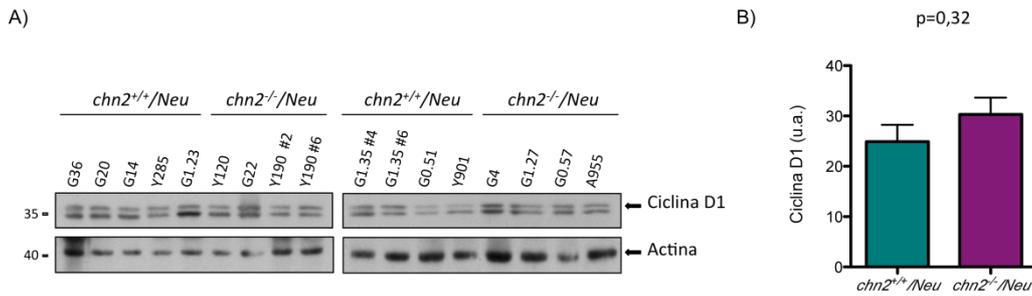


Figura 35. Niveles de expresión de ciclina D1 en tumores de mama de 1 mes A) Western blot de la expresión de ciclina D1 en tejido de tumor de mama (panel superior). Se muestran los niveles de actina como control de carga (panel inferior). B) Cuantificación del nivel de expresión de ciclina D1 respecto a los niveles de expresión de actina. Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante el test de Mann Whitney (Control n=9; KO n=8).

Finalmente, se evaluó la expresión de E-cadherina y β -catenina en la fase temprana de la enfermedad (Fig. 36). Los niveles de E-cadherina fueron similares independientemente a la expresión de β 2-quimerina, mientras que los de β -catenina eran algo más reducidos en las muestras de los ratones KO (Fig. 36).

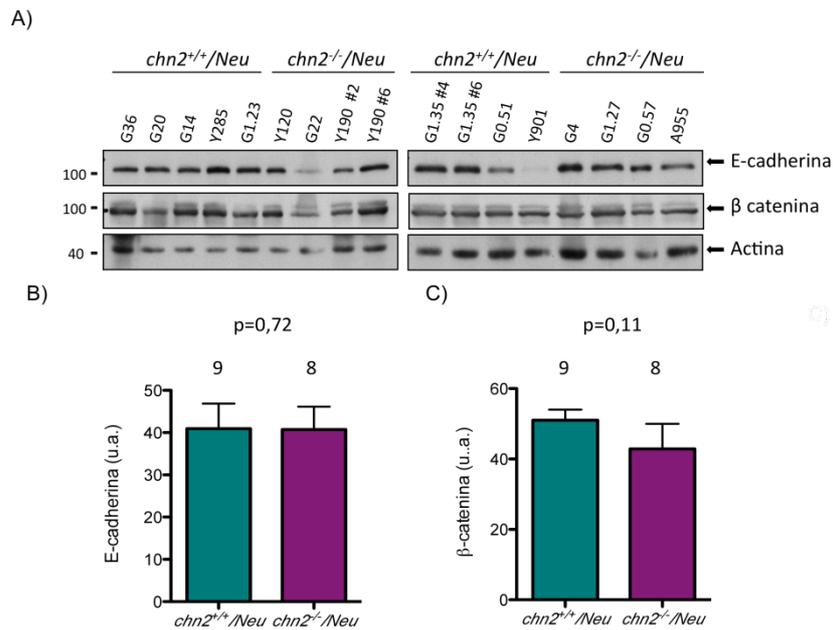


Figura 36. Expresión de E-cadherina y β -catenina en tumores de mama de 1 mes. A) Western blot de la expresión de proteínas de adhesión en tejido de tumor de mama. Los niveles de las diferentes proteínas fueron detectados mediante western blot e inmunodetección con los anticuerpos correspondientes. B) y C) Cuantificación del nivel de expresión de E-cadherina y β -catenina respecto a los niveles de expresión de actina. Los valores representan la media \pm error estándar y fueron comparados mediante el test de Mann Whitney (Control n=9; KO n=8)

El patrón de expresión observado en las proteínas constituyentes principales de las AJ, aunque no mostró diferencias estadísticamente significativas, era opuesto al observado al analizar los tejidos de tumor de mama en la fase tardía de la enfermedad, lo que podría explicarse considerando el papel dual que se le ha dado a la proteína E-cadherina a lo largo del proceso tumorigénico.

En conjunto, los datos obtenidos de la evaluación de las vías de señalización que regulan funciones biológicas asociadas con el cáncer de mama y que se pueden ver afectadas por la expresión de β 2-quimerina muestran ligeras variaciones dependientes del genotipo y de la fase de desarrollo de la enfermedad, temprana o tardía. Además, las leves fluctuaciones encontradas se muestran muy heterogéneas incluso dentro de los individuos de cada población, control o deficiente en β 2-quimerina. Asimismo, las diferencias encontradas no alcanzaron el nivel de significación estadística, de tal manera que no podemos confirmar un impacto especialmente relevante de β 2-quimerina en las vías de señalización implicadas en cáncer de mama con las que se conoce su vinculación.

6. Estudio del papel de β 2-quimerina en otros modelos de cáncer de mama

Con el fin de profundizar en el estudio del papel de β 2-quimerina en el desarrollo del cáncer de mama y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio en el modelo de ratón MMTV/Neu deficiente en β 2-quimerina, especialmente los resultados relacionados con la metástasis, decidimos continuar el estudio utilizando dos líneas celulares representativas de dos de los subtipos de tumores de mama más frecuentes, las líneas MDA-MB-231 y MCF7. El subtipo de cáncer de mama representado por la línea MDA-MB-231 se denomina basal-like, y sus células son triples negativas para el receptor de estrógenos, de progesterona y Her2 (ER-, PgR- y Her2-). La línea MCF7 es representativa del subtipo Luminal A, con células negativas para Her2 y positivas para los receptores hormonales (Her2-, ER+ y PgR+). Otra de las características que diferencia estas líneas celulares es su naturaleza, de tipo epitelial en el caso de la línea MCF7 y mesenquimal en el caso de la línea MDA-MB-231. Además poseen diferente potencial metastásico, siendo más invasiva la línea MDA-MB-231. En este estudio se ha utilizado una subpoblación de la línea MDA-MB-231, denominada LM2, con elevado potencial metastásico a pulmón (ver descripción en Materiales y Métodos).

Como ya se ha explicado en la introducción, se ha descrito que β 2-quimerina tiene niveles endógenos de expresión muy bajos o incluso nulos en los tejidos de tumor de mama. Lo mismo sucede en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, y por extensión la línea LM2, en las que estudios previos demuestran unos niveles llamativamente bajos o casi nulos de mRNA de β 2-quimerina.

Teniendo en cuenta todos estos datos, la aproximación experimental llevada a cabo fue la opuesta a la utilizada en el estudio en ratones MMTV-ErbB2/Neu, es decir, estudiar el efecto de la expresión de β 2-quimerina en estas líneas celulares.

6.1 Generación de líneas estables MCF7 y LM2 con expresión de β 2-quimerina

Para poder evaluar el papel de β 2-quimerina en los diferentes procesos que se suceden durante la tumorigénesis y que están regulados por Rac, se generaron líneas celulares de cáncer de mama LM2 y MCF7 con expresión estable de β 2-quimerina. Las subpoblaciones generadas serán denominadas a partir de ahora LM2- β 2 y MCF7- β 2. Para la generación de estas subpoblaciones se utilizaron dos plásmidos diferentes, en los que se etiquetó la proteína β 2-quimerina con las proteínas fluorescentes naranja (LM2- β 2-OFP) y verde (MCF7- β 2-GFP) para facilitar su selección por citometría de flujo y su seguimiento posterior. La elección de estas etiquetas fluorescentes estuvo condicionada por el fenotipo de las líneas celulares, eligiéndose β 2-quimerina etiquetada con OFP en la línea LM2 ya que estas células expresan de forma estable GFP (ver materiales y métodos). Los niveles de expresión de la proteína β 2-quimerina en las subpoblaciones LM2- β 2 y MCF7- β 2 y la ausencia de expresión de la misma en las subpoblaciones MCF7 y LM2, que a partir de ahora denominaremos "control", se muestran en la figura 37A (paneles inferiores).

6.2 Efecto de β 2-quimerina en la activación de Rac

Tras comprobar los niveles de expresión de β 2-quimerina en las diferentes subpoblaciones de ambas líneas celulares, se cuantificaron en primer lugar los niveles de activación de Rac presentes en las mismas mediante un ensayo de *pull down* (Fig. 37).

Acorde con lo esperado, dada la función RacGAP de β 2-quimerina, la activación de Rac se muestra significativamente reducida en las células que expresan esta proteína. Tanto las líneas celulares LM2- β 2 como MCF7- β 2 tienen unos niveles de Rac-GTP inferiores a los de las células control en condiciones basales. Esta disminución es mucho más pronunciada cuando las células se estimularon con EGF. Se utilizó EGF como estímulo ya que, como se ha explicado anteriormente, se trata de un factor de crecimiento que activa β 2-quimerina a través de la generación de DAG y promueve la inactivación de Rac llevada a cabo por esta proteína.

Una vez corroborada la función de β 2-quimerina en las líneas celulares que habíamos generado, se continuó con el estudio del efecto de esta proteína en las proteínas y procesos celulares regulados por Rac relevantes en cáncer de mama.

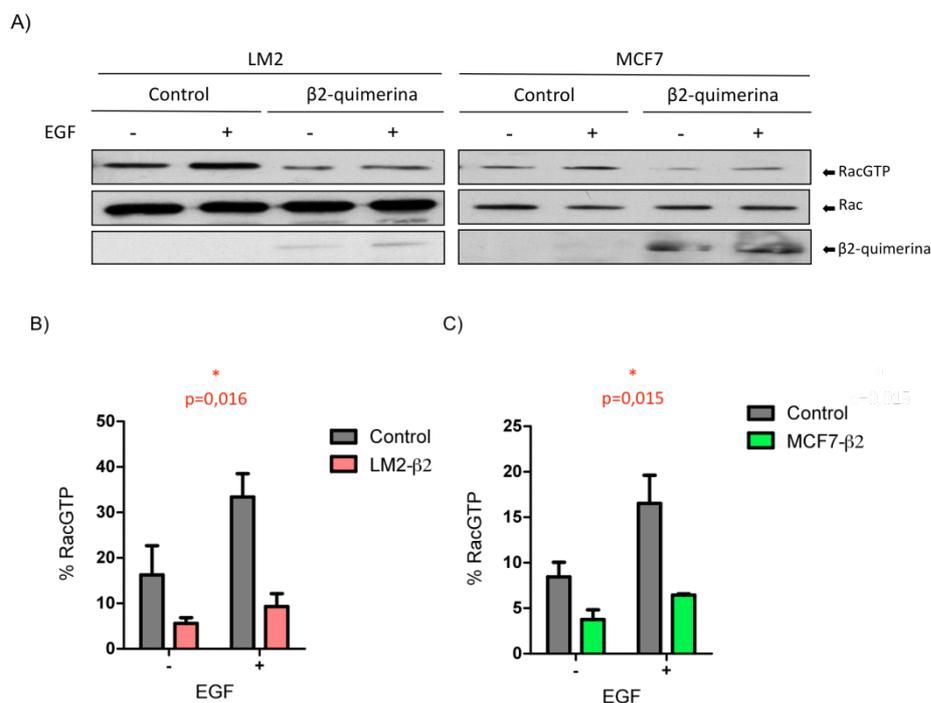


Figura 37. Actividad GAP de β 2-quimerina en líneas celulares de cáncer de mama. A) Resultado representativo de los ensayos de *pull down* para determinar la actividad de β 2-quimerina en las líneas LM2 (paneles de la izquierda) y MCF7 (paneles de la derecha). Paneles superiores: niveles de RacGTP. Paneles intermedios: niveles totales de Rac. Paneles inferiores: expresión de la β 2-quimerina. Niveles de proteína detectados mediante western blot e inmunodetección con anti-Rac y anti- β 2-quimerina respectivamente. **B)** Densitometría de la cantidad de RacGTP respecto a la cantidad de Rac total en las células LM2. **C)** Densitometría de la cantidad de RacGTP respecto a la cantidad de Rac total en las células MCF7. **B)** y **C)** Los ensayos de pull down se realizaron en condiciones basales (-) o tras la estimulación con EGF (100ng/ml) (+). Los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Los datos se compararon mediante el test ANOVA.

6.3 Evaluación de la activación de las rutas PI3K/AKY, ERK y expresión de ciclina D1

De manera similar al estudio que realizamos en el modelo de ratón, analizamos la activación de AKT y ERK, así como la expresión de ciclina D1, por ser proteínas fundamentales en los procesos de supervivencia celular y proliferación. Este estudio se realizó mediante análisis por Western blot de los niveles de fosforilación de AKT y ERK, así como de los niveles de expresión de la proteína ciclina D1, en lisados de cultivos en crecimiento exponencial de las líneas celulares descritas (Fig.38A).

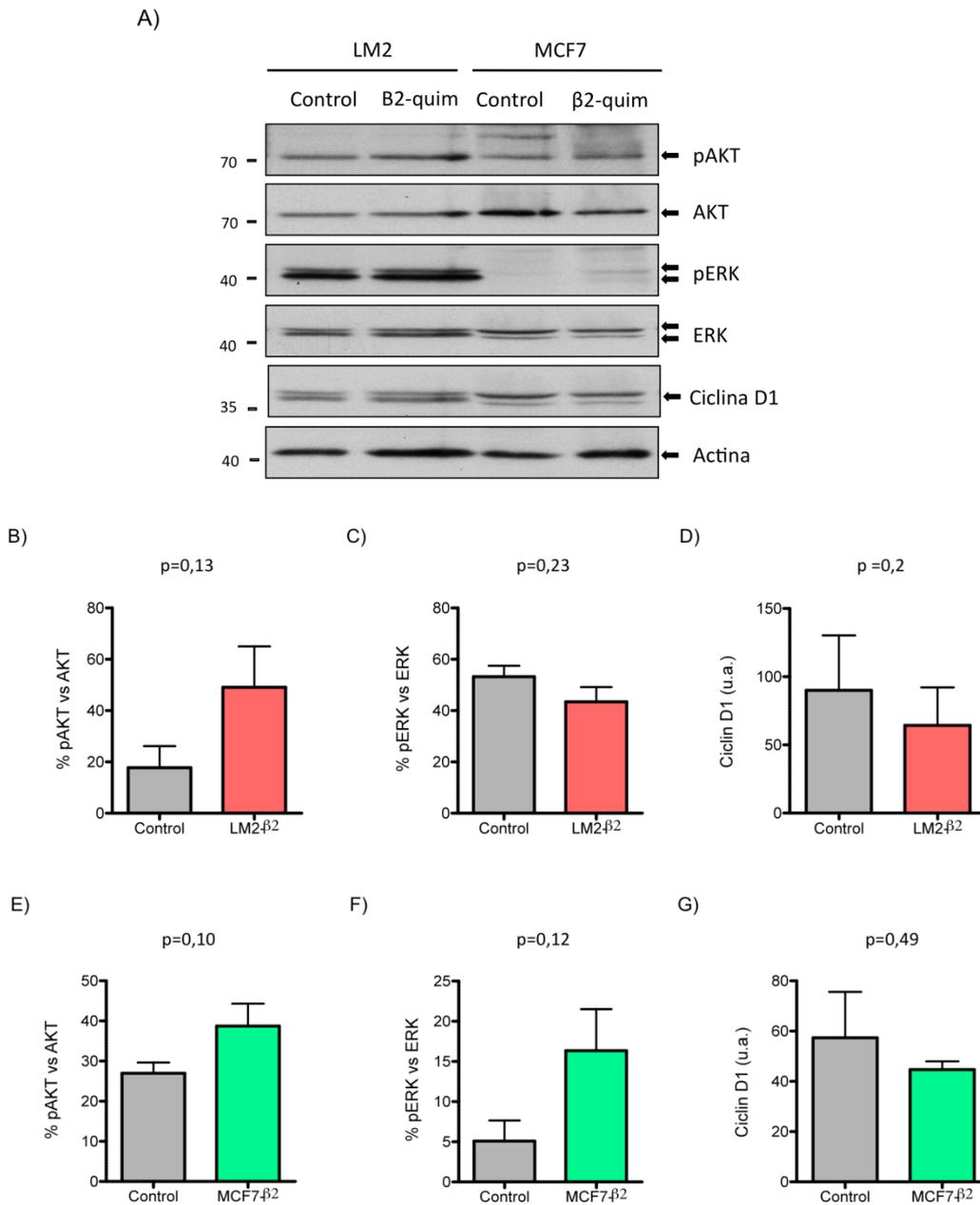


Figura 38. Efecto de β2-quimerina en la fosforilación de AKT, ERK y expresión de ciclina D1 en las líneas celulares de cáncer de mama. A) Western blot representativo de la fosforilación de AKT y ERK y de la expresión de ciclina D1 en las líneas LM2 y MCF7 control y con expresión estable de β2-quimerina. Los niveles de fosforilación y las proteínas totales se analizaron mediante inmunodetección con los anticuerpos correspondientes que se indican a la derecha de cada panel **B), C) y D)** Cuantificación del nivel de expresión de activación de AKT, ERK y expresión de ciclina D1, en la línea LM2, respecto a los niveles de actina **E), F) y G)** Cuantificación del nivel de expresión de activación de AKT, ERK y expresión de ciclina D1, en la línea celular MCF7, respecto a los niveles de actina. Los valores representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes en las líneas celulares LM2 y MCF7 respectivamente. Los datos se compararon mediante el t-test para muestras no pareadas.

De forma general, en ninguno de los casos se observaron diferencias llamativas que llegasen a ser estadísticamente significativas. En el caso de AKT, se observaron niveles de fosforilación algo mayores tanto en las líneas LM2- β 2 como MCF7- β 2 en comparación con las correspondientes líneas control (Fig. 38B y 38E). En cuanto a la fosforilación de ERK, la expresión de β 2-quimerina no afecta a la activación de esta proteína en la línea celular LM2, mientras que se aprecia un ligero incremento en su fosforilación en la línea MCF7- β 2 frente a la línea control (Fig. 38C y 38F).

Se sabe que la expresión de β 2-quimerina en las células MCF7 reduce los niveles de ciclina D1, lo que produce una inhibición en la proliferación celular y parada del ciclo celular en la fase G1/S. En nuestro análisis, la evaluación de los niveles de ciclina D1 confirma las evidencias ya descritas para la línea celular MCF7 y muestra un efecto similar en la línea LM2, ya que en ambos casos se detectó una reducción en los niveles de expresión de ciclina D1 en las subpoblaciones que expresaban β 2-quimerina (Fig. 38D y 38G).

Tras conocer realizar este estudio inicial, decidimos evaluar el impacto de la expresión de β 2-quimerina en la regulación del citoesqueleto de actina, por tratarse ésta de la función principal de Rac.

6.4 Efecto de β 2-quimerina en los procesos mediados por el citoesqueleto

Como ya se ha indicado, la función principal de Rac es la regulación del citoesqueleto de actina. Además, se conoce el papel que ejerce β 2-quimerina, a través de la regulación de Rac, en el control del citoesqueleto de células neuronales. Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad el impacto de la expresión de β 2-quimerina en el citoesqueleto de células de cáncer de mama, a pesar de ser uno de los procesos fundamentales en la progresión tumoral, especialmente en la metástasis. Teniendo esto en cuenta, se plantearon una serie de experimentos encaminados a la evaluación de diferentes procesos directamente ligados con la reorganización del citoesqueleto de actina que tienen lugar durante la progresión tumoral.

6.4.1 Efecto de β 2-quimerina en el citoesqueleto de actina

En una primera aproximación se estudió la organización del citoesqueleto de actina en las líneas celulares control y en las que expresan β 2-quimerina. Con este fin, el citoesqueleto de actina se tiñó utilizando faloidina conjugada con el fluorocromo Alexa Fluor 647. De esta manera se pudo visualizar la actina tanto en las células MCF7- β 2, que expresan β 2-quimerina etiquetada con EGFP, como en las LM2- β 2 en las que β 2-quimerina se etiquetó con OFP. El análisis de estas células por microscopía confocal demostró que existen diferencias tanto en la estructura como de localización de la actina en las células que expresan β 2-quimerina (Fig. 39). Las subpoblaciones LM2- β 2 y MCF7- β 2 se caracterizan por tener una forma más redondeada que las células control y una mayor superficie

Resultados

en contacto con el sustrato. Además, los filamentos de actina se localizan paralelos a la membrana celular en estructuras en forma de anillo y arqueadas, que podrían dificultar la formación de protrusiones y el avance celular. Por el contrario, los filamentos de actina en las células control se localizan perpendiculares a la membrana celular, lo que indicaría la presencia de estructuras relacionadas con el movimiento. Pese a que en ambas poblaciones se detectaron diferencias similares en el citoesqueleto de actina, en el caso de la línea LM2 éstas son más llamativas, observándose la ausencia de fibras de estrés en casi la totalidad de la subpoblación LM2- β 2.

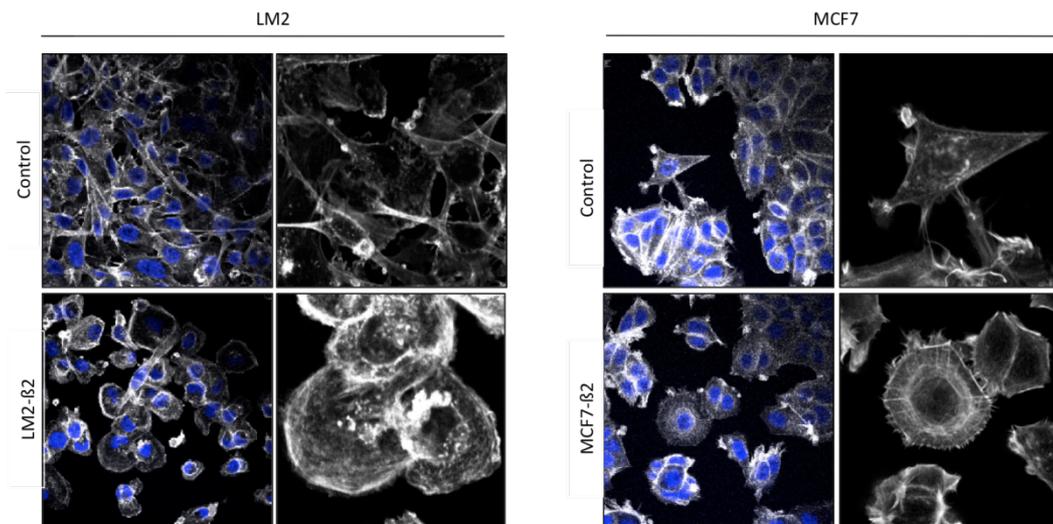


Figura 39. Efecto de β 2-quimerina en el citoesqueleto de actina en líneas celulares de cáncer de mama. Imágenes de microscopía confocal de las células LM2 (izquierda) y MCF7 (derecha) (60x). En los paneles de la izquierda se muestra el citoesqueleto de actina en blanco (y los núcleos en azul (tinción con DAPI)). En los paneles de la derecha se muestra en detalle las estructuras formadas por el citoesqueleto de actina.

Como ya se ha explicado en el apartado de la introducción, una de las causas directamente relacionadas con la alta mortalidad asociada al cáncer de mama se debe a la capacidad de las células tumorales de metastatizar. La diseminación metastásica de las células tumorales circulantes implica varios pasos secuenciales, entre los que se incluyen la adhesión al endotelio vascular, la migración a través de la barrera endotelial y, como consecuencia, la invasión a través de la matriz extracelular para alcanzar el nicho secundario. Por tanto, tras detectar los cambios producidos por β 2-quimerina en el citoesqueleto de actina en las líneas celulares analizadas, se decidió profundizar en los procesos celulares importantes para la metástasis en cáncer de mama.

En primer lugar se evaluó el efecto de β 2-quimerina en la adhesión, migración e invasión celular. Estos estudios se realizaron en las células LM2 ya que se trata de una subpoblación derivada de la línea MDA-MB-231, como ya se ha explicado, con alto potencial metastásico.

6.4.2 Efecto de $\beta 2$ -quimerina en la adhesión celular

El análisis del citoesqueleto de actina descrito en el apartado anterior mostraba que el área o superficie que ocupaban las células en presencia de $\beta 2$ -quimerina era mayor que en las células control, indicando que esta proteína podía estar afectando la adherencia al sustrato. Este mismo fenotipo se observó cuando las células LM2 se incubaron utilizando colágeno IV como matriz extracelular. Se eligió este sustrato por tratarse del componente principal de la lámina basal de los epitelios y ser por tanto relevante en el cáncer de mama (Fig. 40A, paneles a y b).

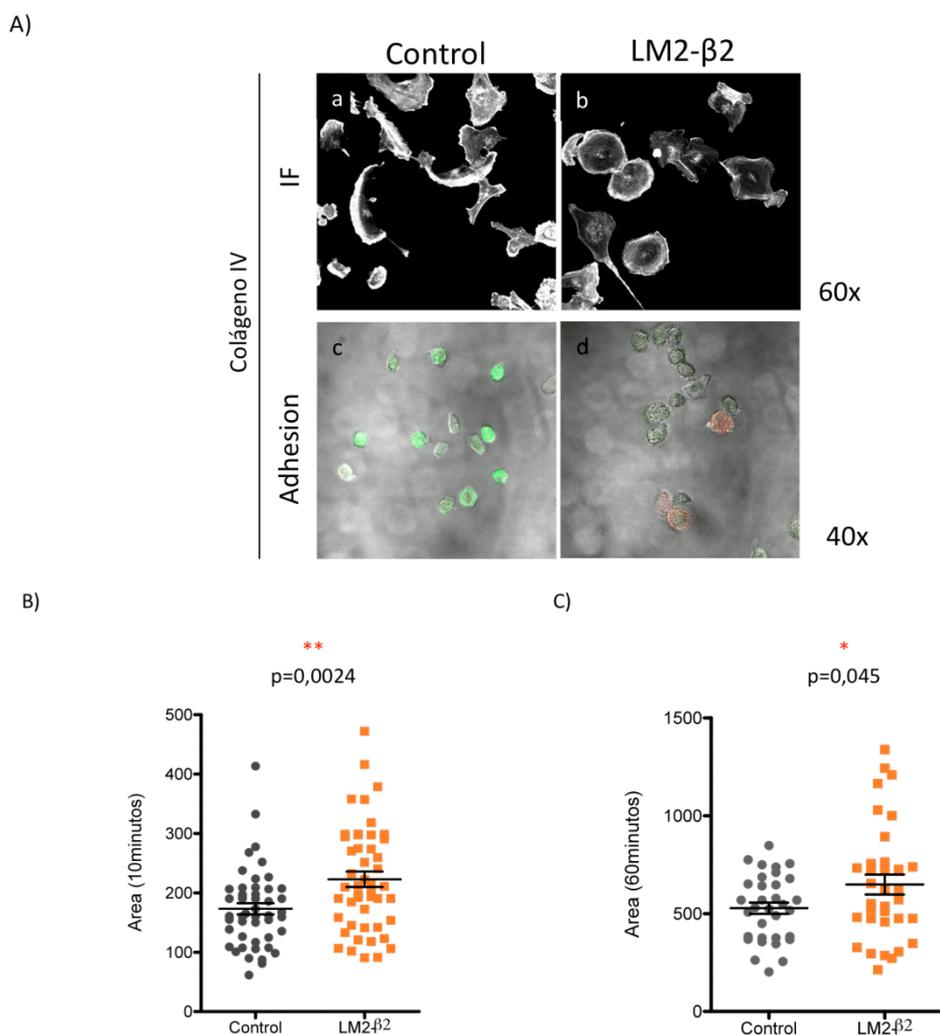


Figura 40. Efecto de $\beta 2$ -quimerina en la adhesión celular de la línea LM2. A) Paneles superiores: imagen de microscopía confocal que muestra el citoesqueleto de actina mediante el marcaje con faloidina en las poblaciones control (a) y LM2- $\beta 2$ (b) (60x). Paneles inferiores: Imágenes representativas de la adhesión de las células control (c) y LM2- $\beta 2$ (d) a la matriz extracelular de colágeno IV (30ug/ml) tras 10 minutos de incubación (40x). B) y C) Representación gráfica de la adhesión celular al inicio del ensayo (10min) y al final del ensayo (60min) respectivamente. Las gráficas muestran la media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes. Los valores fueron comparados mediante t-test para muestras no pareadas.

Resultados

Para ampliar este estudio se procedió al análisis de la adhesión a colágeno IV y posterior cuantificación de la superficie celular a los 10 y 60 minutos de incubación. Como puede verse en la figura 40, las células de la subpoblación LM2- β 2 mostraron un área mayor que las células control incluso en las condiciones de menor tiempo de incubación (10 minutos). Este resultado se confirmó por cuantificación del área celular. Las diferencias en cuanto a la superficie de contacto celular que de las células LM2- β 2 en comparación a la superficie de las células control fueron estadísticamente significativas tanto a los 10 minutos ($p = 0,0024$) como tras 60 minutos de adhesión a colágeno IV ($p = 0,045$) (Fig. 40B y 40C respectivamente).

Uno de los factores esenciales en el establecimiento de los contactos entre la célula y el sustrato son las adhesiones focales. Para estudiar si el aumento de la superficie celular era consecuencia de un cambio en la formación de estas estructuras, se estudiaron tanto el número como la localización de las adhesiones focales mediante microscopía confocal tras la tinción de vinculina, proteína constitutiva principal de este tipo de adhesiones (Fig. 41). En una primera aproximación se analizaron las adhesiones focales en ausencia de matriz extracelular. Tras no observar diferencias, procedimos a la detección de las adhesiones focales en presencia de colágeno IV.

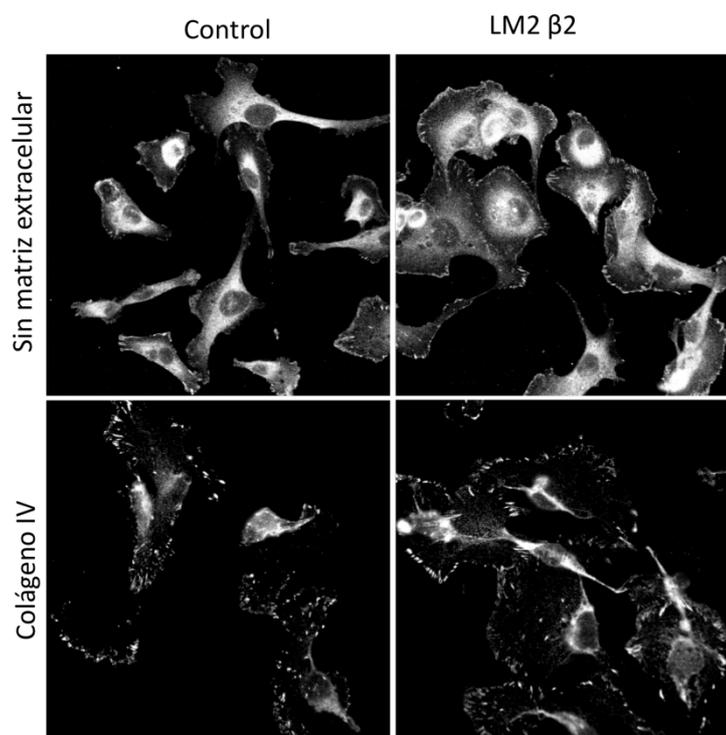


Figura 41. Formación de adhesiones focales en las células LM2. Imágenes de microscopía confocal de las adhesiones focales visualizadas mediante tinción de vinculina (60x) en células control (paneles de la izquierda) y células LM2- β 2 (paneles de la derecha). Las adhesiones se analizaron sin matriz extracelular (paneles superiores) o en presencia de colágeno IV (30ug/ml) (paneles inferiores).

Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias en ninguno de los dos casos, lo que sugiere que la expresión de β 2-quimerina no interviene en la adhesión celular a través de la regulación de estas estructuras adherentes, de forma que la mayor extensión de la superficie celular de las células que expresan β 2-quimerina se produce de manera independiente a los focos de adhesión.

6.4.3 Efecto de β 2-quimerina en la migración celular

Para conocer el impacto de la expresión de β 2-quimerina en la migración celular se realizó un experimento de cierre de herida o *wound healing* en el cual se monitorizó la velocidad de avance del frente celular para cerrar la “herida” (Fig. 42).

Con el fin de asegurar que en nuestro ensayo el avance celular era producido exclusivamente por el proceso de migración, sin sufrir interferencias del proceso de proliferación, se realizó el experimento en condiciones de ausencia de suero. Asimismo, para corroborar que no había diferencias en la proliferación celular durante el experimento, se contabilizaron las células control y LM2- β 2 al comienzo y al finalizar el experimento. Con este fin se realizó un experimento en el que se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (Fig. 42A). Se obtuvieron valores semejantes en el número de células de las dos poblaciones, de manera que podemos asegurar que las diferencias observadas eran debidas únicamente a la migración celular.

Como puede verse en la figura, las células LM2 que expresan β 2-quimerina mostraron una menor velocidad del frente de avance celular, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p = 0,004$). Este resultado demuestra que la expresión de β 2-quimerina inhibe la migración celular en células de cáncer de mama con elevado potencial metastásico (LM2), resultado acorde con lo descrito para otros tipos celulares.

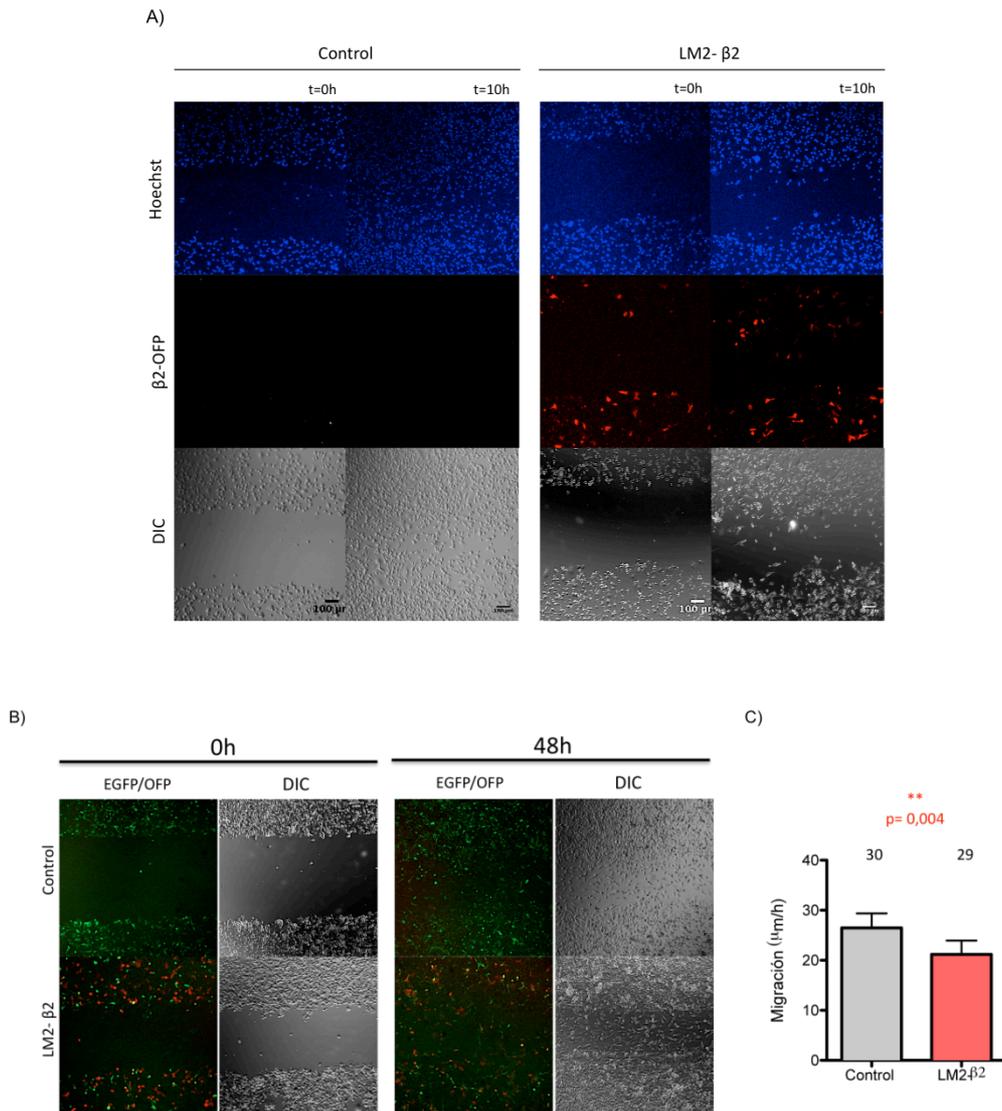


Figura 42. Efecto de β2-quimerina en la migración de las células LM2. A) Control de la proliferación durante el ensayo de migración celular en las células control (paneles de la izquierda) y LM2-β2 (paneles de la derecha) al comienzo del experimento (t=0h) y al final (t=10h). Paneles superiores: núcleos celulares teñidos con DAPI. Paneles intermedios: expresión de β2-quimerina. Paneles inferiores: transmisión DIC. **B)** Ensayo de cierre de herida o *wound healing*. Se muestra como avanza el frente de células en el tiempo en las células control (izquierda) y LM2-β2 (derecha). Paneles de la izquierda: separación de las células mediante una herida (t=0h). Paneles de la derecha: frente de avance al cierre de la herida (t=48h). Las células LM2 se detectan en verde por expresar EGFP. En naranja se muestra la expresión de OFP-β2-quimerina en estas células. **C)** Representación gráfica de la velocidad del cierre de la herida. Los valores representan la media ± error estándar de siete experimentos independientes y fueron comparados mediante t-test para muestras no pareadas.

6.4.4 Invasión celular

Una vez comprobado que los cambios observados en el citoesqueleto de actina se estaban traduciendo en cambios funcionales como la migración, parecía obvio pensar que la expresión de $\beta 2$ -quimerina podría tener consecuencias en la invasión celular. Para comprobar esta hipótesis se analizó la capacidad de las células de atravesar una matriz celular reconstruida (matrigel) en presencia de suero fetal bovino al 10%, utilizando cámaras *transwells*, en las subpoblaciones LM2- $\beta 2$ y su correspondiente control. Como control se cuantificó la invasión celular en condiciones de ausencia de quimioatrayente (FBS). Tras un periodo de tiempo de incubación de entre 18 y 30 horas se visualizaron las células que habían migrado a través del matrigel (invasión) mediante la tinción de las mismas con cristal violeta. (Fig. 43).

Como se puede ver en la figura, tras 18h de incubación un mayor número de células de la población control fue capaz de atravesar la matriz de matrigel en comparación con las células de la subpoblación LM2- $\beta 2$. Estas diferencias se hicieron mucho más patentes cuando el tiempo de incubación fue superior (30h).

Estos resultados mostraron una reducción en el potencial invasivo de las células en presencia de $\beta 2$ -quimerina, resultado acorde con el efecto de esta proteína en la migración celular.

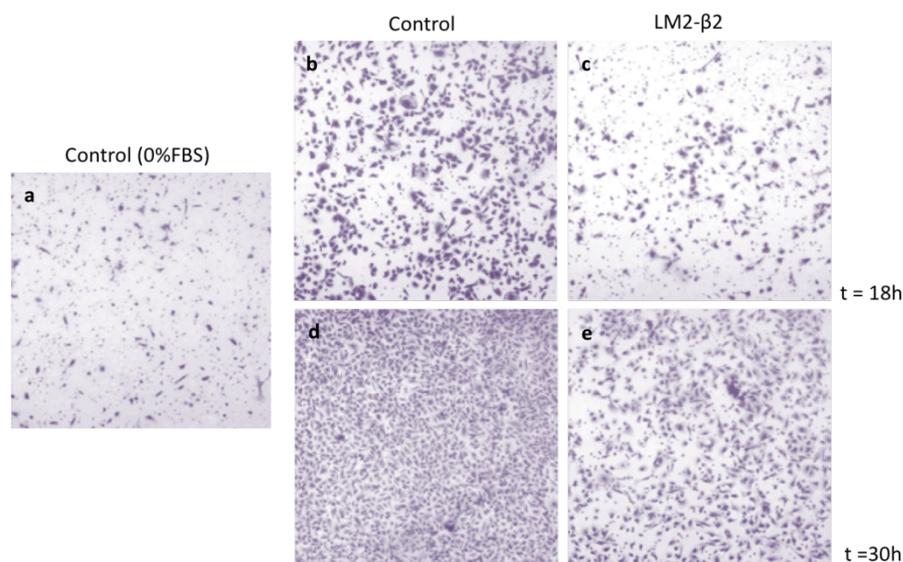


Figura 43. Invasión celular en Matrigel con suero bovino fetal como quimioatrayente. Imágenes representativas de la tinción de cristal violeta de las membranas porosas. **a)** Imagen representativa de la membrana control donde se muestran las células migratorias por la fuerza de la gravedad en ausencia de quimioatrayente (10x). **b)** y **c)** Imágenes representativas de las células control y LM2- $\beta 2$ respectivamente tras 18h de incubación (10x). **d)** y **e)** Imágenes representativas de las células control y clon $\beta 2$ -quimerina respectivamente tras 30h de incubación (10x). Las imágenes representan el fenotipo observado en cuatro experimentos independientes.

El conjunto de los datos obtenidos en análisis de la adhesión, migración e invasión de la línea celular LM2 ponen de manifiesto que β 2-quimerina participa en la regulación de estos procesos, todos ellos implicados en la metástasis. Es por tanto que podemos asumir que β 2-quimerina regula dichos procesos mediante el control del citoesqueleto de actina a través de su actividad GAP sobre Rac.

Para continuar con el estudio de la función de β 2-quimerina en los procesos importantes en la metástasis, decidimos evaluar el efecto de esta proteína en las uniones adherentes, que normalmente están afectadas en el proceso de desdiferenciación celular y transición epitelio-mesénquima. Estos estudios se realizaron utilizando las líneas epiteliales MCF7 y MCF7- β 2, puesto que las células LM2 carecen de estas estructuras por tratarse de células de tipo mesenquimal.

6.5 Estudio del papel de β 2-quimerina en las uniones célula-célula

6.5.1 Efecto en la expresión y localización de E-cadherina

Para el estudio de efecto de β 2-quimerina en las uniones célula-célula de tipo adherente (AJ) evaluamos la localización subcelular y los niveles de expresión de E-cadherina (Fig. 44).

La detección mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal de E-cadherina reveló que, mientras que las células MCF7 control tienen una distribución homogénea de E-cadherina en la periferia de las células en contacto, en las células MCF7- β 2 las zonas de conexión intercelular muestran una clara disminución en esta proteína (Fig. 44A).

Para corroborar este fenotipo se determinaron los niveles de E-cadherina en ambas subpoblaciones celulares mediante Western blot (Fig. 44B). Tras cuantificar los resultados obtenidos en este análisis observamos una reducción estadísticamente significativa ($p= 0,01$) de E-cadherina en los lisados de la línea celular que expresaban β 2-quimerina (Fig. 44C).

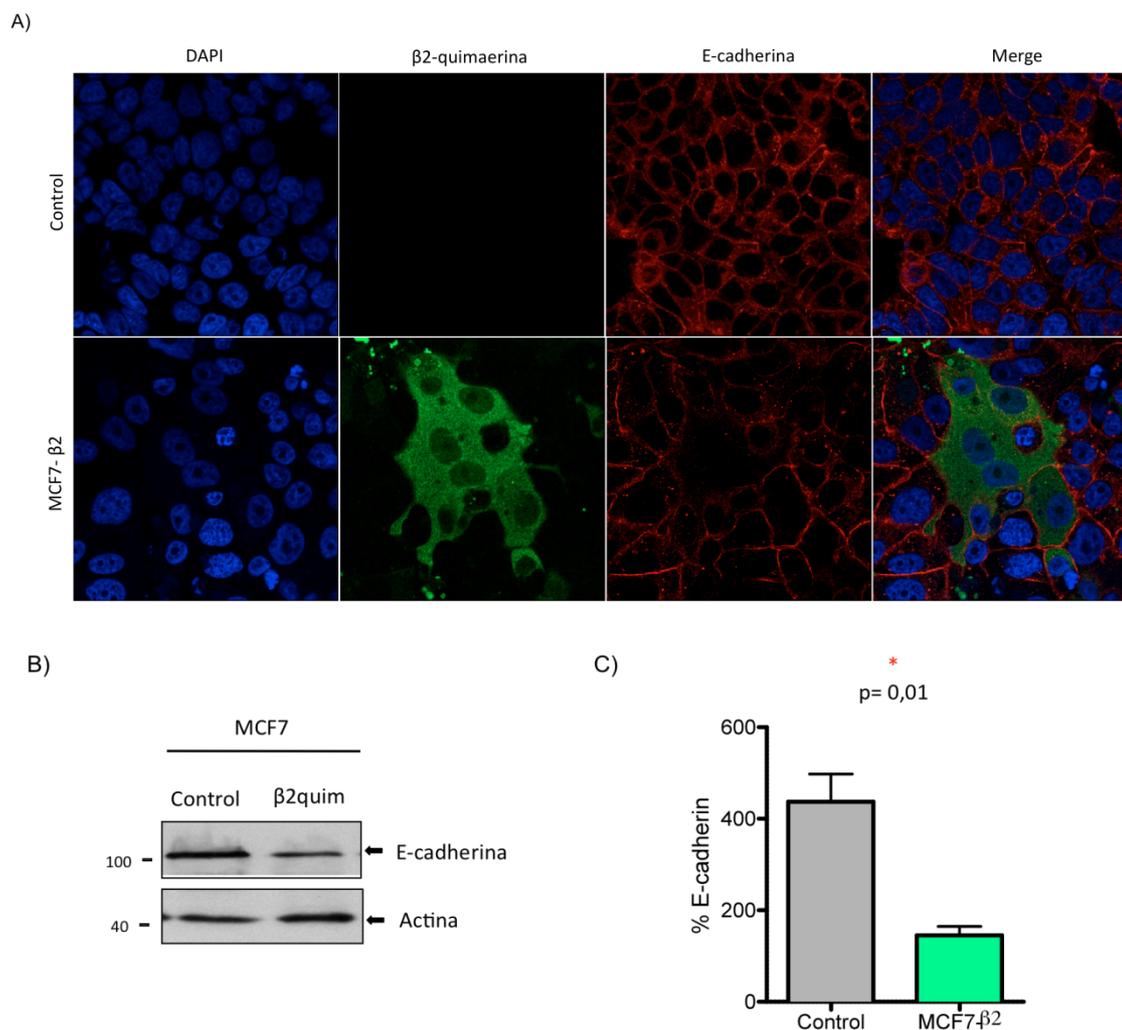


Figura 44. Efecto de β2-quimerina en la expresión y localización de E-cadherina en las células MCF7. A) Imágenes de microscopía confocal que muestran la localización de la E-cadherina en las células MCF7 control (paneles superiores) y MCF7-β2 (paneles inferiores). Paneles de la izquierda: núcleos celulares en azul (DAPI). Paneles intermedios: expresión de la β2-quimerina en verde (EGFP) y E-cadherina en rojo (anti-E-cadherina). Paneles de la derecha: Imagen de fusión de los diferentes canales. **B)** Análisis de la expresión de E-cadherina por Western blot. Se muestran los niveles de actina como control de carga. **C)** Representación gráfica de la densitometría de la cantidad de E-cadherina respecto a la cantidad actina. Los valores muestran la media ± error estándar de tres experimentos independientes y fueron comparados mediante el t-test para muestras no pareadas

Los resultados obtenidos demuestran por primera vez la implicación de β2-quimerina en el control de los niveles celulares de E-cadherina. Decidimos entonces profundizar en el estudio del papel de β2-quimerina en los contactos célula-célula mediante un ensayo funcional en el que no interviniesen los contactos que las células pueden establecer con el sustrato, por lo que se eligió el ensayo de agregación en gotas colgantes o ensayo de *hanging drops*.

6.5.2 Estudio de agregación celular mediante *hanging drops*

Para el análisis de la formación de agregados celulares, se incubaron durante 12 h ambas subpoblaciones de MCF7, en forma de gotas colgantes y se examinaron las estructuras generadas por cada una de ellas. En el caso de la subpoblación control, donde los niveles de E-cadherina se encontraban intactos, se formaron estructuras organizadas con aspecto filamentososo, en forma de malla o red. Por el contrario, las células de la subpoblación que expresa β 2-quimerina y que tiene reducidos los niveles de E-cadherina, se unían formando pequeños agregados (Fig. 45).

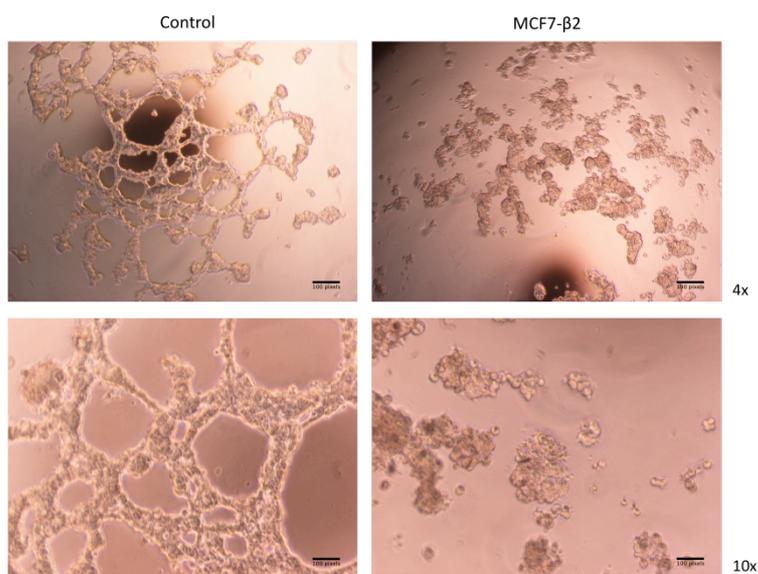


Figura 45. Efecto de β 2-quimerina en la agregación de las células MCF7. Experimento de gotas colgadas o *hanging drops* con las células MCF7. Imágenes de microscopía de las células control (paneles de la izquierda) y MCF7- β 2-quimerina (paneles de la derecha) tras una incubación ON. Las imágenes superiores se realizaron con un objetivo de 4x y las inferiores más en detalle con un objetivo 10x.

Mediante disgregación mecánica de los agregados formados, fuimos capaces de conocer la fuerza que tenían las uniones celulares que se habían creado en ambos casos. El tamaño de los agregados obtenidos tras la rotura de los contactos intercelulares muestra una mayor fuerza en este tipo de contactos en el caso de las células control frente a las células que expresan β 2-quimerina (Fig. 46A).

Cuando se cuantificó fue el diámetro de los agregados formados comprobamos que los agregados eran mucho más pequeños en la subpoblación MCF7- β 2, con una media de $0,16 \text{ mm} \pm 0,007$ de diámetro en comparación con el diámetro medio de los agregados observados en la subpoblación control que fue de $0,33 \text{ mm} \pm 0,02$ (Fig. 46B y 46C). Esta diferencia, estadísticamente significativa ($p < 0,001$), indicaba que la presencia de β 2-quimerina estaría

suprimiendo la expresión de la E-cadherina y por tanto, alterando la formación de contactos célula-célula.

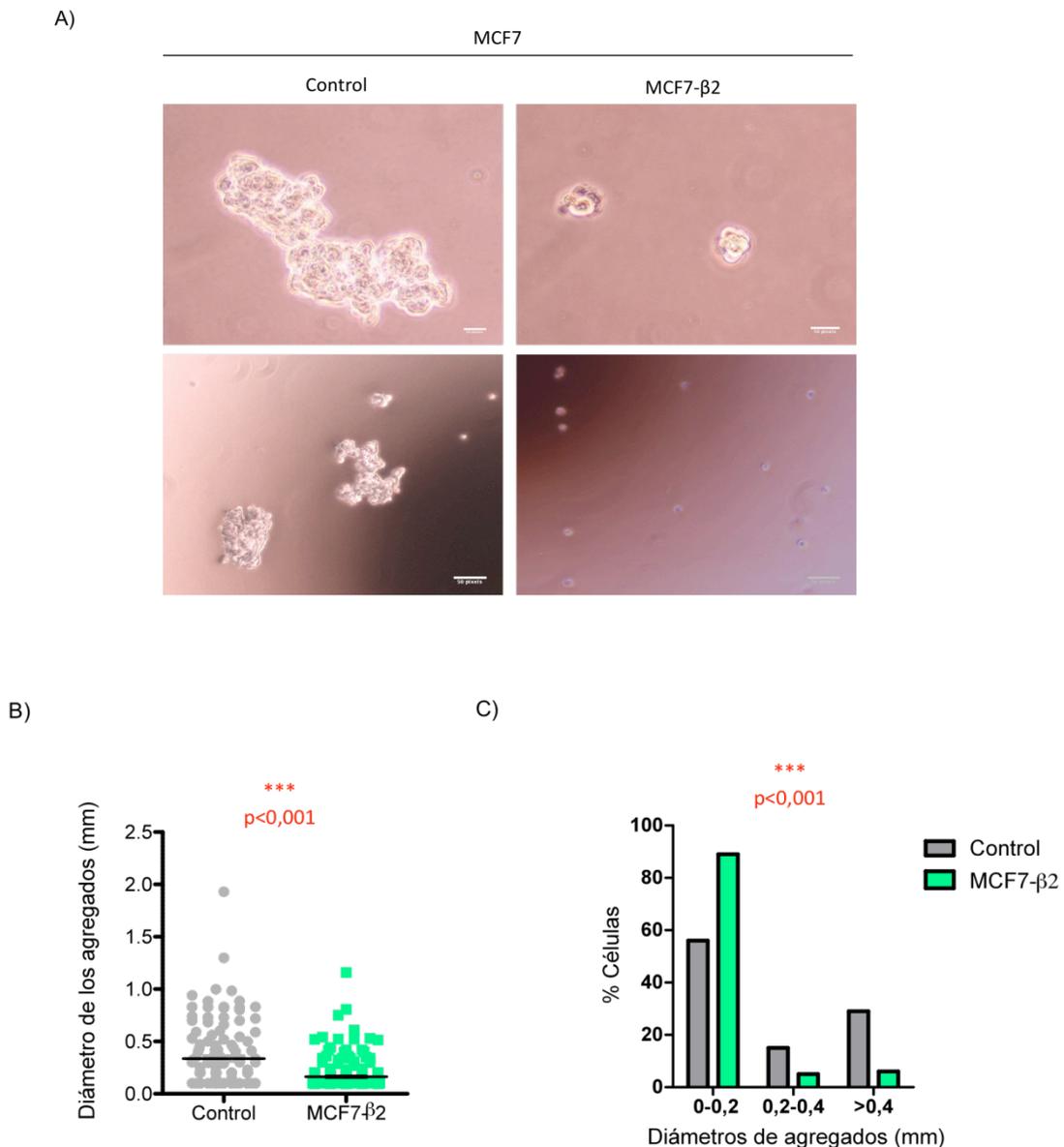


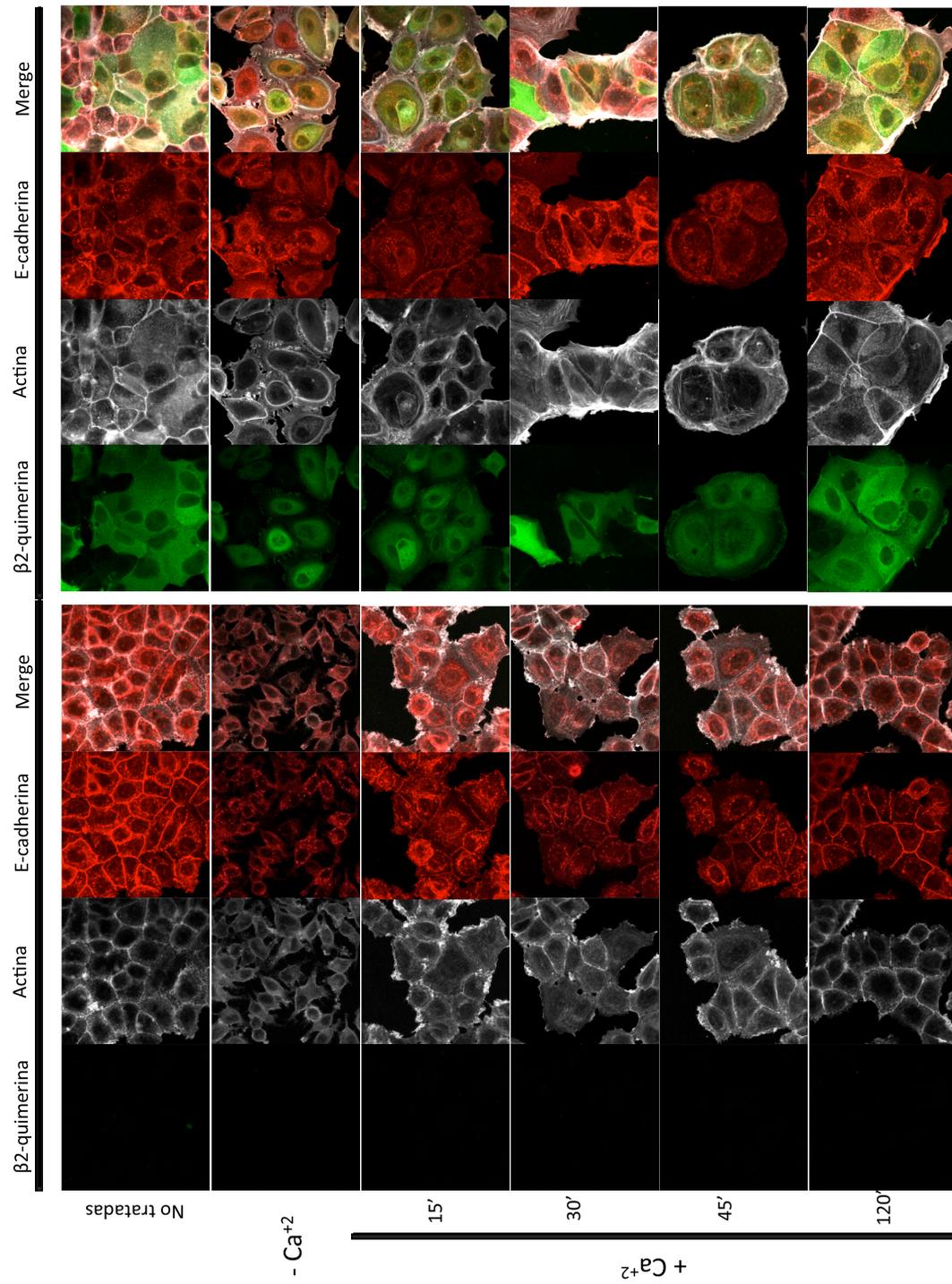
Figura 46. Evaluación de la agregación y fuerza de los contactos intercelulares en las líneas MCF7 de cáncer de mama. A) Imágenes de microscopía representativas del tipo de agregados generados en cada una de las subpoblaciones, control (paneles de la izquierda) y MCF7-β2 (paneles de la derecha) tras disgregación mecánica. Las imágenes superiores se realizaron con un objetivo de 4x y las inferiores más en detalle con un objetivo 10x. **B)** Representación gráfica del diámetro de los agregados generados en cada una de las subpoblaciones tras la disgregación mecánica. Los valores muestran la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Los datos fueron comparados mediante t-test para muestras no pareadas. **C)** Representación gráfica del porcentaje de células de cada subpoblación clasificadas según el diámetro de los agregados generados tras la disgregación mecánica. Los datos se compararon mediante el test de Chi cuadrado.

6.5.3 Papel de β 2-quimerina en la formación de contactos intercelulares *de novo* a través E-cadherina mediados por calcio

Teniendo en cuenta que la expresión de β 2-quimerina en las células MCF7 afecta a los niveles de expresión de E-cadherina y a la fuerza de las uniones célula-célula quisimos estudiar si el mecanismo de formación de los contactos estaba afectado, es decir, si β 2-quimerina ejercía su función sobre la E-cadherina en el establecimiento de las uniones o sólo en el mantenimiento. Ambos efectos podrían estar mediados por β 2-quimerina a través de la regulación del citoesqueleto, pues se sabe que el citoesqueleto de actina en las células epiteliales se encarga no sólo del mantenimiento de las uniones intercelulares, sino también de la formación de las mismas (Fig. 47).

Las AJ son uniones calcio dependientes que cuentan con una zona extracelular, donde se produce la unión de homodímeros de E-cadherina, y una zona intracelular, en la que interaccionan con el conjunto de moléculas denominadas *Armadillo* (p120 catenina, placoglobina y β -catenina) y con α -catenina, la cual en última instancia permite la asociación de las AJ con el citoesqueleto de actina. Para evaluar la formación de los contactos intercelulares, mediados por E-cadherina, se realizó un experimento en el que se evaluó la dinámica de formación de AJ de forma dependiente de calcio. En este experimento se elimina el calcio del medio de cultivo para provocar la destrucción de las AJ, de forma que se sincronice la formación de las mismas una vez sea reestablecido el calcio, lo que permite la evaluación de la formación *de novo* de los contactos AJ y el estudio dinámico de las proteínas que las constituyen.

Figura 47. Dinámica de formación de contactos intercelulares mediada por calcio en células MCF7 en presencia de β 2-quimerina. Paneles de la izquierda. Subpoblación de células control. Paneles de la derecha: Subpoblación de células MCF7- β 2. En figura se muestran las imágenes de inmunofluorescencia realizadas mediante microscopía confocal representativas del proceso progresivo de formación de contactos intercelulares (60x). Como control se utilizaron las células de ambas poblaciones en condiciones estables de calcio es decir, sin tratar. Se muestra la pérdida de contactos tras la incubación de las células (ON) en medio sin calcio, y como se van recuperando los mismos a intervalos de tiempo (15'-120') tras ser restablecida la concentración de calcio en el medio. EL marcaje utilizado en la inmunofluorescencia corresponde (de izquierda a derecha) a la expresión de β 2-quimerina en verde (GFP), la actina en blanco (anti-faloidina), la E-cadherina en rojo (anti-E-cadherina) y la combinación de todos los canales.



Resultados

Los resultados muestran como en ausencia de tratamiento, es decir, en condiciones de crecimiento exponencial de las células con la concentración de calcio normal, sólo las células de la subpoblación control presentan E-cadherina localizada en los contactos célula-célula. Tras la eliminación del calcio en el medio celular todas las células pierden las conexiones intercelulares, ya que la formación de dímeros de E-cadherina en las zonas extracelulares es un proceso dependiente de calcio. Cuando se restablece el calcio en el medio celular se aprecia como en las células control se recupera la localización de la E-cadherina en la AJ de forma progresiva. Las imágenes de inmunofluorescencia revelan la formación de AJ en la subpoblación control tras un tiempo de incubación en presencia de calcio con localización leve o parcial de la E-cadherina tras 15 minutos de incubación, siendo la localización total al cabo de 2h. Por el contrario en las células de la subpoblación MCF7- β 2, pese a que los contactos celulares se recuperan tras restablecer los niveles basales de calcio, no se observa la re-localización de la E-cadherina.

Estos datos indican que β 2-quimerina regula los contactos intercelulares mediados por AJ en las células epiteliales, por lo que la disminución de esta proteína en tumores afecta el proceso de dediferenciación tumoral.

DISCUSIÓN

1. Función de β 2-quimerina en cáncer de mama tipo HER2 positivo en el modelo de ratón MMTV/Neu

β 2-quimerina es uno de los miembros de la familia de las quimerinas, una familia de proteínas con actividad GAP específica de Rac. Rac es una Rho GTPasa que regula múltiples procesos celulares, muchos de los cuales se encuentran alterados en el cáncer de mama, como son la proliferación, supervivencia, motilidad y desdiferenciación celular. Evidencias previas a este estudio han demostrado la reducción de β 2-quimerina en cáncer de mama, sugiriendo un papel de β 2-quimerina como supresor tumoral en esta patología. La inactivación de esta proteína GAP tendría como resultado un incremento en la actividad de Rac. Apoyando esta hipótesis la hiperactivación de Rac1 ha sido asociada con el incremento de proliferación e invasión en el cáncer de mama.

Es importante comenzar explicando que la mayoría de estudios que apoyan el papel de β 2-quimerina como supresor tumoral han sido realizados en modelos celulares y los datos que se conocen en muestras tumorales humanas son muy escasas o incluso nulas en el caso de modelos *in vivo*. Es por ello que nos pareció interesante conocer el papel exacto de β 2-quimerina en un modelo complejo como es el de ratón y analizar las diferentes fases de la evolución y progresión maligna tumoral.

Para evaluar el papel de β 2-quimerina en el desarrollo del cáncer de mama *in vivo* se generó un modelo de ratón en el que se eliminó la expresión de esta isoforma de las quimerinas en ratones transgénicos MMTV/Neu en el que se sobreexpresa el receptor ErbB2.

1.1 β 2-quimerina tienen un papel esencial en las fases iniciales del proceso tumoral, pero favorece un fenotipo tumoral menos agresivo durante la evolución del cáncer de mama

La evaluación del desarrollo y progresión del cáncer de mama en el modelo de ratón MMTV/Neu deficiente en β 2-quimerina reveló en primer lugar una modificación drástica en el tiempo de latencia tumoral, adelantándose la aparición del tumor primario una media de tres meses en ausencia de esta proteína (Fig. 21A). Asimismo, el número de lesiones preneoplásicas que presentaban las glándulas mamarias en estos ratones fue muy superior a la que presentaba el grupo control (Fig. 24). Estos resultados demuestran por primera vez una función de β 2-quimerina en el desarrollo del cáncer de mama *in vivo*. Este modelo de ratón reproduce el efecto que tiene una disminución en los niveles de esta proteína en humanos ya que los estudios previamente explicados²²⁷, en los que se analizó de forma masiva la curva de supervivencia (Kaplan-Meier) en pacientes de cáncer de mama, en función de los niveles de expresión de mRNA de gran multitud de genes, entre los que se encontraba β 2-quimerina, (Figura 16) indicó un tiempo de latencia menor en el caso de niveles inferiores de

β 2-quimerina, lo cual indica que el impacto de la función biológica de β 2-quimerina se está produciendo en las fases iniciales del desarrollo del cáncer de mama.

En contra de lo esperado, no se observaron diferencias significativas en el resto de parámetros analizados, incluyendo el número de tumores, la carga tumoral o la velocidad de crecimiento tumoral (Figuras 22 y 23). No obstante, aunque los parámetros analizados no muestran diferencias significativas, si se observa una tendencia recurrente en todos ellos, para los casos de los tumores de los ratones KO de β 2-quimerina, a la reducción del crecimiento tumoral, con menor volumen del tumor primario, carga tumoral total y velocidad de crecimiento, datos que sugieren una ralentización del proceso oncogénico asociada al defecto de β 2-quimerina. Estos resultados difieren de los descritos en un estudio previo en el que se evaluó el papel de β 2-quimerina en el desarrollo tumoral mediante la inyección de células F3II en ratón BALB/c, las cuales expresaban el dominio catalítico (GAP) de β 2-quimerina. Los resultados demostraron que no existían diferencias en cuanto al tiempo de latencia o incidencia tumoral, pero sí en el crecimiento tumoral, el cual se veía reducido en presencia del dominio GAP de β 2-quimerina²²⁸. Podemos entender la discrepancia entre los resultados obtenidos en cada uno de los estudios teniendo en cuenta que no se trata de modelos comparables (animal y celular). Y, además en el estudio previo se analizó el impacto de β 2-quimerina en el proceso tumoral utilizando únicamente el dominio catalítico GAP, es decir, sin verse afectada por la regulación celular que media la actividad de la proteína cuando ésta se encuentra completa, como es nuestro caso.

El análisis histopatológico de los tumores confirmó de forma generalizada que la eliminación de β 2-quimerina en los ratones MMTV/Neu reduce el grado histológico, generando tumores más diferenciados y con menor índice mitótico. Asimismo, los ratones del grupo control fueron más hemorrágicos y con mayor necrosis que los del grupo KO, diferencias que resultaron obvias incluso macroscópicamente (Fig. 25), todo ello indicativo de tumores menos agresivos en los ratones KO.

La necrosis tumoral normalmente se produce porque la proliferación celular no se da de forma paralela a la formación de vasos sanguíneos, con lo que existe una falta de los aportes nutricionales necesarios para el crecimiento del tumor. Así, en tumores altamente proliferativos es frecuente la aparición de zonas necróticas, salvo que proliferación y angiogénesis se encuentren acopladas produciéndose entonces un crecimiento tumoral con una velocidad dependiente de dicho acoplamiento.

Cuando evaluamos la angiogénesis en los tumores de los ratones control y KO, encontramos que la vascularización era similar independientemente del genotipo (Fig. 28), ya que la cuantificación de los vasos mediante tinción de CD31, que identifica las células endoteliales del tumor, reflejó niveles

semejantes. Asimismo, el patrón vascular observado tras la evaluación histológica de los tejidos no reflejó diferencias significativas. Por lo tanto, la reducción en el área de necrosis de los tumores de los ratones KO no se debe a una mayor vascularización de los mismos. Sin embargo, al analizar la proliferación en los tumores, tanto por determinación del índice mitótico, como mediante tinción de Ki67, observamos una marcada reducción en el caso de los tumores de los ratones deficientes en β 2-quimerina (Fig. 26). Este resultado explicaría en parte la velocidad de crecimiento tumoral inferior así como la reducción de tejido necrótico observada en los tumores de los ratones KO.

El fenotipo observado en cuanto a la proliferación tumoral de los ratones KO fue contrario al esperado, ya que estudios previos realizados con la línea celular de cáncer de mama MCF7, en los que se sobreexpresión β 2-quimerina, mostraron una reducción tanto en la activación de Rac como en la proliferación como consecuencia de la disminución del nivel de expresión de la proteína ciclina D1^{181, 228}, lo que hacía esperar un efecto opuesto al observado. La sobreexpresión de ciclina D1 es un factor importante en la patogénesis del cáncer de mama tanto en humanos como en ratones MMTV/Neu^{234, 235} por lo que evaluamos si la expresión de esta proteína estaba alterada en los tumores de los ratones KO de β 2-quimerina.

En primer lugar comprobamos que en estos ratones la eliminación de β 2-quimerina producía unos niveles de Rac activado significativamente aumentados en los tumores (Figura 30), corroborando la función de β 2-quimerina en la regulación de Rac en este modelo y descartando que la regulación de Rac estuviera siendo compensada por otras GAPs en ausencia de esta proteína. Sin embargo, al analizar los niveles de ciclina D1 en las muestras tumorales de ambos genotipos no se observaron diferencias dependientes de la expresión de β 2-quimerina (Figura 32), lo que descartó a esta proteína como causa de la diferencia observada en la proliferación tumoral. Esta disparidad en cuanto al efecto de β 2-quimerina en la proliferación en los tumores de ratones MMTV/Neu y células MCF7 puede explicarse debido a la diferentes activación de las rutas de replicación que produce en ambos modelos, ya que en ratones MMTV/Neu se debe a la sobreexpresión de ErbB2²³⁶, lo que no ocurre en las células MCF7.

La sobreexpresión de ErbB2 en ratones MMTV/Neu produce una sobreactivación de varias vías de señalización, entre las que se encuentra la ruta ERK1/2^{237, 238}, la cual como se ha explicado se encuentra regulada por Rac²³⁹. Una de las funciones biológicas principales de ERK es la regulación la proliferación celular, que puede ejercerse a través de la regulación de ciclina D1²⁴⁰, pero también por otros mecanismos como la inactivación del inhibidor del ciclo celular p27²⁴¹. Se ha descrito que β 2-quimerina puede regular la proliferación celular a través de la activación de ERK en otros modelos celulares²⁴² por lo que diferencias en la activación de esta ruta en los tumores de los ratones KO podrían contribuir a la alteración observada en la proliferación.

Sin embargo, en este estudio encontramos que el grupo de los tumores de ratones KO presentaba un niveles de ERK fosforilado semejantes al grupo control (Figura 31C), lo que descartó el efecto de β 2-quimerina en la activación de esta ruta en el modelo MMTV/Neu.

Además del efecto en la proliferación celular, observamos un aumento llamativo de los niveles de expresión de caspasa-3 activa en ausencia de β 2-quimerina, lo que indica un incremento significativo de la apoptosis (Figura 27). Aunque no se ha descrito un impacto directo de las quimerinas en apoptosis, un estudio demuestra que las células de cáncer de mama F3II transfectadas con el dominio GAP de β 2-quimerina son más sensibles a la apoptosis tras el tratamiento con estatinas²⁴³. De nuevo, el resultado obtenido en los ratones KO es contrario a estos datos, ya que se observa más apoptosis en ausencia de β 2-quimerina.

Una de las rutas de señalización importantes para la supervivencia celular y apoptosis que se encuentra activada en ratones MMTV/Neu es la ruta PI3K/AKT²³⁶. La proteína AKT inhibe a Bad, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, por lo que una alteración en la activación de AKT podría repercutir en la tasa de apoptosis^{244, 245}. Sin embargo, en nuestro estudio se observó que la activación de AKT en los tumores de mama era similar independientemente de la expresión de β 2-quimerina (Figura 31B). No conocemos en la actualidad los mecanismos por el que la eliminación de β 2-quimerina puede repercutir en una mayor apoptosis en tumores, pero puede estar asociado a la mayor actividad de Rac, ya que esta GTPasa puede tener una función tanto protectora como a favor de la muerte celular^{246 247}.

En resumen, los resultados del análisis de la activación de ERK, AKT y expresión de ciclina D1, proteínas que forman parte de las vías de señalización implicadas en cáncer de mama que se encuentran bajo la influencia de la actividad de Rac, no muestran diferencias llamativas asociadas a la expresión de β 2-quimerina, ni en la fase tardía del desarrollo tumoral ni en fases más tempranas, como demuestra el análisis que realizamos en tumores tras un mes de evolución de la enfermedad²⁴⁸.

Rac se encuentra modulando múltiples procesos a través de una compleja red de señalización en la que toman parte multitud de proteínas. De tal forma que, no podemos descartar la posibilidad de que las diferencias encontradas en proliferación y apoptosis no sean efecto de la regulación de Rac sobre proteínas diferentes a las analizadas, pese a tratarse ERK, AKT y ciclina D1 de las candidatas prioritarias, por contar con antecedentes que demuestran su vinculación con estos procesos. El factor NF- κ B, por ejemplo, sería una proteína interesante para analizar, pues podría ayudar a explicar ambos fenómenos en paralelo, ya que se sabe que el factor NF- κ B regula la expresión de ciclina D1 junto con ERK²⁴⁹ y además juega un papel relevante en los procesos de muerte celular.

Pese a que la aparición más temprana de tumores de mama indica un efecto claro de β 2-quimerina en la fase inicial de la oncogénesis, los mecanismos moleculares por los que β 2-quimerina contribuye al fenotipo pretumoral están aún por determinar.

Alguna de las hipótesis que existe para dar respuesta a este fenotipo se centra en la posibilidad de que el proceso de desarrollo mamario presente defectos en ausencia de β 2-quimerina. Sin embargo, aunque no hemos analizado este aspecto, las hembras del grupo de ratones KO tienen camadas viables lo que parece indicar que no existen defectos en la funcionalidad de la mama. No obstante, teniendo en cuenta la importancia que tienen las quimerinas en el desarrollo en otros órganos^{217,218,242,250}, no podemos excluir esta posibilidad. Asimismo, la deficiencia de β 2-quimerina en el tejido de mama podría producir un incremento en la proliferación basal en mamas normales, aunque no lo hayamos detectado en el tejido tumoral. En este sentido, se ha descrito que la sobreexpresión de β 2-quimerina en células epiteliales de mama no tumorales (MCF10A), inhibe la expresión de ciclina D1, produciendo un efecto anti-proliferativo en esta línea celular²⁵¹. Por otra parte, se sabe que los tumores están compuestos por poblaciones heterogéneas de células, entre las que se incluyen las denominadas células tumorales de iniciación (del inglés *tumor initiating cells* o TIC)²⁵². De tal manera que el fenotipo observado sería un posible efecto de β 2-quimerina en estas células madre cancerígenas²⁵³, pues el modelo de cáncer de mama MMTV/neu en el que hemos estudiado el papel β 2-quimerina pondría de manifiesto la función protectora de esta proteína frente a la transformación de las células sanas en TICs, ya que se ha comprobado que su ausencia reduce significativamente el tiempo de latencia al desarrollo tumoral.

1.2 Las deficiencia de β 2-quimerina reduce la susceptibilidad al desarrollo de metástasis pulmonar en el modelo de ratón MMTV/Neu

El modelo de ratón MMTV/Neu se caracteriza por producir metástasis únicamente a pulmón^{231,254} y se ha descrito que lo hace con una incidencia del 70% (Laboratorios Jackson). Nuestros resultados guardan concordancia en el caso del grupo control, donde el 66% de los individuos analizados mostró metástasis en pulmón. Por el contrario, el grupo de ratones MMTV/Neu deficientes en β 2-quimerina presentaba una reducción en la incidencia, detectándose metástasis solo en el 40% de los ratones analizados (Figura 29A). Además, la comparación del número de impactos metastásicos por pulmón reveló de forma inesperada una mayor multiplicidad en el caso de los pulmones de los ratones KO (Figura 29B). Este resultado nos resultó llamativo dado que la incidencia metastásica en estos ratones era menor. A la vista de estos datos, podemos interpretar que la eliminación de β 2-quimerina reduce la susceptibilidad de las células tumorales a metastatizar, pero en el caso de que las células se ‘comprometan’ a la desdiferenciación o EMT, el potencial metastásico que presentan es superior al de las células tumorales de los ratones del grupo control.

Entre los factores que contribuyen a la adquisición de un fenotipo metastásico e invasivo de las células de cáncer de mama se encuentra una disminución o pérdida de la adhesión célula-célula. La proteína E-cadherina se ha entendido como supresor tumoral e inhibidora de la invasión, ya que favorece el anclaje celular disminuyendo así el potencial invasivo. Además, la reducción de los complejos cadherina-catenina ha sido ampliamente descrita en el estudio del cáncer de mama⁵. Los niveles de expresión tanto de E-cadherina como de β -catenina, ambas proteínas principales en el establecimiento de las AJ, en las muestras tumorales de nuestro modelo de ratón MMTV/Neu, muestran una tendencia a una mayor expresión en los tumores deficientes en β 2-quimerina (Figura 33B y 33C). Acorde con nuestro resultado, está descrita la pérdida de contactos intercelulares en células de cáncer de mama MCF7 cuando se sobreexpresa Tiam-1, un GEF específico de Rac²⁵⁵.

Otros factores que contribuyen a la migración de las células tumorales son la activación de MAPKs, que regulan la migración a través de distintos mecanismos. En carcinomas de mama se produce un incremento en la actividad de ERK en comparación con el tejido mamario normal o con las lesiones benignas²⁵⁶ que además parece tener relación con la migración celular²⁵⁷. β 2-quimerina podría regular la metástasis mediante el control de la motilidad celular a través de la regulación de esta vía, ya que se ha descrito el papel de esta proteína como nexo la relación entre la activación de ERK y la estabilidad de las AJ^{242,258}. En relación a esto último, se ha descrito una marcada localización de ERK activado en la membrana celular en células epiteliales deficientes de β 2-quimerina que presentaban uniones adherentes aberrantes²⁵⁸.

En nuestro estudio, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de activación de ERK, sólo un ligero aumento en ausencia de β 2-quimerina, de forma similar a lo que ocurre con la expresión de E-cadherina y β -catenina. Estos datos podrían hacer pensar que la deficiencia β 2-quimerina produce un refuerzo de las uniones intercelulares de tipo AJ por medio de la sobreexpresión de las proteínas que las integran, disminuyendo así la capacidad de migración celular. Esta respuesta a la eliminación de β 2-quimerina explicaría la menor susceptibilidad al desarrollo de la metástasis en los ratones KO de esta proteína. Sin embargo, las diferencias de expresión de las proteínas analizadas, así como la similitud en la localización de E-cadherina observada en las tinciones de las secciones tumorales ambos genotipos (Figura 33A), no sugieren cambios muy llamativos que puedan explicar este comportamiento. Además, el análisis de la expresión de estas proteínas en la fase temprana del desarrollo tumoral tampoco mostró diferencias significativas (Figura 36). Como dato que nos llamó la atención, observamos una reducción en la expresión de β -catenina en la fase temprana en ausencia de β 2-quimerina, lo que podría traducirse en una disminución de la estabilidad en las uniones adherentes.

Al comparar los resultados obtenidos en la evaluación de la metástasis con los de la desdiferenciación tumoral, a través de la expresión de E-cadherina y β -

catenina, podríamos interpretar de forma general que en ausencia de β 2-quimerina se favorece la desdiferenciación de las células tumorales, por desestabilización de las AJ en la fase inicial del desarrollo tumoral (reducción de β -catenina) y estabilización de los contactos celulares en la fase tardía (incremento de E-cadherina y β -catenina). Este efecto se podría explicar atendiendo a dos criterios, el papel dual de la E-cadherina en el proceso de desdiferenciación y a la diferente regulación mediada por Rac, la cual se ha comprobado que depende de la cantidad de Rac activo, el origen celular y la matriz extracelular⁵.

Una de las características de las células tumorales es la capacidad de desdiferenciación desde el fenotipo epitelial al mesenquimal (EMT). Las diferentes fases del proceso de EMT que pueden verse afectadas por la función de β 2-quimerina, así como las vías de señalización implicadas en ellas, se estudiaron utilizando líneas celulares y sus resultados pasan a discutirse en los apartados posteriores.

2. La expresión de β 2-quimerina en líneas celulares de cáncer de mama reduce la activación de Rac, modifica la reorganización del citoesqueleto de actina y retrasa la transición epitelio-mesénquima

Con el fin de profundizar en el estudio del papel de β 2-quimerina en las diferentes fases del proceso tumoral y teniendo presentes los datos obtenidos en el modelo animal MMTV/Neu deficientes en β 2-quimerina, especialmente los resultados relacionados con la metástasis, pensamos que la utilización de modelos celulares nos resultarían de gran ayuda, pues este tipo de modelos permiten: i) analizar el papel de β 2-quimerina en otros subtipos de cáncer de mama, en nuestro caso, Luminal A con la línea MCF7 y claudín low con la línea LM2, ii) estudiar el efecto de β 2-quimerina sobre células con fenotipo epitelial (MCF7) y mesenquimal (LM2) que permita un análisis más amplio y detallado de los diferentes procesos que tienen lugar en la desdiferenciación y iii) estudiar las diferentes vías de señalización y funciones biológicas controladas por las mismas en un modelo más sencillo y mejor controlado.

Los niveles de activación de Rac en presencia de β 2-quimerina mostraron en ambas líneas celulares una reducción significativa en condiciones basales, que se vio exacerbada cuando las células fueron estimuladas con EGF (Figura 37). Estos resultados ya habían sido descritos para la línea MCF7^{259, 260}, pero no para la línea LM2. Por lo tanto, nuestro estudio confirma los resultados previos y aporta nuevas evidencias, en un subtipo diferente de cáncer de mama, que ayudan a entender la función de β 2-quimerina en la patología. Tras corroborar las diferencias de actividad en presencia de β 2-quimerina se evaluaron las vías de señalización que al encontrarse regulada por Rac pueden estar modificadas y

como consecuencia pueden tener un efecto en diferentes procesos biológicos relevantes para la oncogénesis.

De forma similar a los estudios bioquímicos realizados en el modelo de ratón, los datos obtenidos tanto para la línea celular MCF7 como para LM2, no mostraban diferencias estadísticamente significativas en los niveles de activación de ERK y AKT como en la expresión de ciclina D1. Estos experimentos se realizaron en condiciones de crecimiento exponencial, sin estimular las poblaciones celulares, de forma que no podemos estar seguros del nivel de activación de β 2-quimerina en el momento de realizar el ensayo. Aunque las diferencias no alcanzaban significación estadística, observamos en la línea MCF7 que los niveles de activación tanto de AKT como de ERK eran elevados en la subpoblación MCF7- β 2 comparados con el control (Figura 38E y 38F), mientras que la expresión de ciclina D1 no mostraba diferencias (Figura 38G). Estos datos se encontraban a priori en contradicción con lo descrito en la literatura pues se había demostrado en la misma línea celular que la inactivación de Rac por sobreexpresión de β 2-quimerina causaba supresión en la activación de ERK²²⁹. Además, como ya se ha mencionado, la sobreexpresión del dominio catalítico GAP de β 2-quimerina era capaz de reducir el nivel de ciclina D1 y la proliferación^{228, 237}. Como ya hemos comentado, nuestros resultados no son comparables por tratarse de un análisis realizado en condiciones de crecimiento exponencial. En el caso de la línea LM2, la activación de AKT se encontraba incrementada en la subpoblación LM2- β 2 frente al control (Figura 38B), al contrario que la activación de ERK y la expresión de ciclina D1, que son inferiores en presencia de β 2-quimerina (Figura 38C y 38D). Estos resultados podrían sugerir que en presencia de β 2-quimerina se está inhibiendo la proliferación celular, como estaba descrito para otras líneas de cáncer de mama.

Como ya se ha explicado, la función principal de Rac es la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina. En concreto participa en el control de la formación de lamelipodios y ruffles de la membrana a través del efector SCAR/WAVE y el complejo Arp2/3 encargado de la polimerización de actina ramificada²⁶¹. Es por tanto que las modificaciones en la activación de Rac, a través de la actividad GAP de β 2-quimerina, pueden tener un impacto en procesos celulares dinámicos mediados por el citoesqueleto de actina, como el establecimiento de la morfología, la adhesión tanto al sustrato como intercelular y la migración. En nuestro estudio, hemos evaluado este aspecto del papel de β 2-quimerina en cáncer de mama mediante estudios de microscopía confocal.

Los antecedentes en el estudio del efecto de α -quimerina en la dinámica de reorganización del citoesqueleto de actina, en fibroblastos y células de neuroblastoma, habían puesto en evidencia la relevancia de su papel en la en la morfología celular y en la formación de estructuras de tipo lamelipodio²⁶² favoreciendo la dinámica del proceso. De forma paralela el análisis por

microscopía reveló la ausencia de fibras de estrés y la inhibición de los complejos de adhesión focal mediados por vinculina, en presencia de α -quimerina.

En nuestro estudio se observó como la expresión de β 2-quimerina tanto en células MCF7 como LM2 produjo una modificación aparente de la estructura celular (Figura 39). Las subpoblaciones celulares que expresaban β 2-quimerina mostraban una morfología redondeada, donde los filamentos de actina se localizaban en estructuras arqueadas en la periferia celular. Por otra parte, pudimos detectar la presencia de estructuras típicamente asociadas con el movimiento celular o procesos dinámicos como son las fibras de estrés de forma casi exclusiva en las células de las subpoblaciones control. Es importante resaltar ya se había demostrado con anterioridad a nuestro estudio que la expresión del dominio catalítico de β 2-quimerina reducía la polimerización de actina en la zona de la membrana plasmática en células F3II, lo que dañaba la formación de protusiones²⁶³, lo cual apoya el fenotipo observado en nuestros ensayos.

Los cambios en la formación de estructuras dinámicas del citoesqueleto de actina en presencia de β 2-quimerina se tradujeron en cambios en diferentes procesos implicados en la EMT que tiene lugar durante la metástasis tumoral. Así nuestras observaciones demostraron que la subpoblación LM2- β 2 tenía una mayor área de adhesión a colágeno tipo IV que la subpoblación control (Figura 40), matriz extracelular que es el componente principal de la lámina basal del epitelio, lugar donde se inician la mayoría de los tumores de mama. La adhesión celular al sustrato es posible mediante el establecimiento de varias estructuras, entre ellas las adhesiones focales²⁶⁴, que pueden estar reguladas por Rac². El análisis de las adhesiones focales sin embargo, no mostró diferencias significativas dependientes de la expresión de β 2-quimerina (Figura 41). Hay que tener en cuenta que estas estructuras son muy dinámicas que participan no sólo de la adhesión celular, sino también en el proceso de movimiento celular, creando puntos de unión con el sustrato en el frente de avance de la célula y en el desensamblaje de los contactos en la zona posterior²⁶⁵. Por tanto, no podemos descartar que existan diferencias en estos procesos dinámicos dependientes de los cambios en el citoesqueleto de actina mediadas por β 2-quimerina que no se hayan detectado al haber realizado el análisis de las adhesiones focales en células fijadas.

En estudios previos ya se había puesto de manifiesto la relación entre la expresión de las quimerinas, las alteraciones en el citoesqueleto de actina y el proceso de adhesión, ya que la sobreexpresión de la isoforma α 1-quimerina en fibroblastos NIH3T3 demostró modificaciones en las propiedades adhesivas de éstas células a través de la ausencia de estructuras del citoesqueleto de actina como las fibras de estrés. Además la presencia de α 1-quimerina producía defectos en la formación de los complejos de adhesión mediados por las proteínas vinculina y talina, lo cual inhibía el establecimiento de adhesiones

focales²⁶⁶, lo que ayudaría a explicar nuestras evidencias en la modificación de las estructuras del citoesqueleto de actina y en el proceso de adhesión.

Por otra parte, la migración y la invasión celular se vieron significativamente reducidas en la línea LM2- β 2 en comparación con las células control (Figura 42 y 43). Los resultados del ensayo de 'cierre de herida' (Figura 42) se encuentran en concordancia con varios estudios previos, en los que se demostraba como la sobreexpresión de β 2-quimerina reducía la migración celular tanto en la línea celular de cáncer de mama MCF7²⁶⁰ como en células de músculo liso en presencia de β 2-quimerina²⁶⁷. Además, nuestros datos también se encuentran apoyados por evidencias obtenidas con la línea celular F3II en las cuales se reducía de forma llamativa la migración celular en presencia del dominio GAP de β 2-quimerina²⁶³. Incluso, el silenciamiento de la expresión endógena de β 2-quimerina en células HeLa, demostraba el incremento de la migración celular debido a una mayor activación de Rac²⁶⁸.

Por lo que nuestro estudio con la línea LM2 sirve para aportar información sobre el papel de β 2-quimerina en otro tipo de cáncer de mama y demuestra que la capacidad supresora de β 2-quimerina en la migración tanto de células que no han sufrido la desdiferenciación, de tipo epitelial (MCF7) como las que han sido diferenciadas a mesenquimales (LM2).

La reducción en la invasión de las células LM2- β 2 observada en el ensayo realizado de matrigel, no puede ser contrastada específicamente con ningún ensayo previo. A pesar de ello, los antecedentes ya comentadas en los procesos de adhesión y migración en presencia de β 2-quimerina permiten explicar el fenotipo de invasión observado por tratarse de los diferentes mecanismos secuenciales que realizan las células durante la misma. Otro de los procesos esenciales durante la invasión celular es la secreción de proteasas capaces de degradar la matriz extracelular. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento con células de carcinoma de mama de ratón (F3II) en presencia del dominio GAP de β 2-quimerina, no muestran diferencias en los niveles de activación de las metaloproteasas^{263,269}.

Uno de los marcadores principales de los contactos intercelulares (AJ) y de la transición epitelio-mesénquima es la E-cadherina^{88,270-272}. Existen varios estudios que analizan la desdiferenciación celular, a través de la evaluación de las AJ, en relación al nivel de actividad de Rac¹³⁵, pues este tipo de adhesiones son esenciales para el mantenimiento de las características epiteliales de las células¹³⁶. Por otra parte, el papel descrito para E-cadherina en la tumorigénesis, como se ha explicado anteriormente, es dual, por lo que la relación existente entre los niveles de expresión de la proteína y la metástasis es controvertida. Por un lado existen estudios que demuestran que la reducción en los niveles de expresión de E-cadherina implica la pérdida de adhesiones (AJ) y con ello se favorece la transformación y metástasis²⁷³. Por otra parte, otras publicaciones apoyan una situación oscilante en los niveles de expresión de E-

cadherina dependiendo de la fase de transformación en la que se encuentren las células tumorales²⁷⁴.

En nuestro análisis del papel de β 2-quimerina en la formación de las AJ comprobamos que la expresión de E-cadherina estaba marcadamente reducida en presencia de β 2-quimerina en las células MCF7 (células MCF7- β 2) (Figura 44). Un resultado similar se había descrito para la línea celular MDCK en la que se sobreexpresaba Rac dominante negativo¹⁵⁷, sugiriendo que la disminución de E-cadherina en la línea MCF7 puede ser el efecto de la inactivación de Rac por sobreexpresión de β 2-quimerina.

En los estudios de microscopía se detectó cómo a pesar de reducirse la localización de E-cadherina en las zonas de AJ, no se apreciaba una desestabilización global de los contactos intercelulares (Figura 44). Este resultado sugiere que β 2-quimerina no afecta a otras proteínas implicadas en los contactos célula-célula, resultado acorde con la especificidad en la modulación de E-cadherina ejercida por Rac¹⁵⁵, que no afecta a otro tipo de adhesiones. Otra explicación plausible es que la inactivación de Rac no es suficiente para la completa desestabilización de las AJ, ya que ensayos con un mutante dominante negativo de Rac (RacT17N) muestran que el bloqueo de la formación de AJ dependientes de E-cadherina no es absoluto^{157, 275}.

La evaluación de los contactos intercelulares mediante un ensayo de agregación celular en gotas colgadas demostró que la expresión de β 2-quimerina no solo dañaba el establecimiento de contactos célula-célula, sino que además la fuerza de unión de los contactos establecidos se veía reducida (Figura 46). En relación a este último resultado, se sabe que el citoesqueleto de actina no se ve afectado por la unión homofílica de E-cadherinas²⁷⁶, pero los filamentos de actina sí son relevantes para la adhesión, pues refuerzan las uniones de E-cadherina²⁷⁷. El conjunto de estos resultados nos puso de manifiesto que la expresión de β 2-quimerina en la línea MCF7 distorsionaba llamativamente la estabilidad de las AJ a través de la reducción de E-cadherina.

Un estudio en la línea celular MDCK, demostrada que durante la formación de los contactos intercelulares, la acumulación de Rac era exclusiva de los puntos de inicio de los contactos, mientras que E-cadherina se redistribuye por toda la longitud del contacto²⁷⁴. Dado que la actuación de Rac en el establecimiento de las AJ parecía estar implicada especialmente en la fase inicial de la formación de los contactos, decidimos analizar en qué paso del establecimiento de las AJ estaba afectando la presencia de β 2-quimerina, bien directamente en la formación de las adhesiones o por lo contrario si era un efecto posterior. El ensayo de formación de contactos intercelulares *de novo* mediados por calcio, demostró la capacidad de recuperación de los contactos celulares dependientes de calcio, tanto en presencia como en ausencia de β 2-quimerina (Figura 47). Sin embargo, sólo las células control lograron restablecer la localización de E-cadherina en las AJ recién formadas. En cuanto

a la reorganización del citoesqueleto de actina, no se vieron diferencias tan llamativas como en el caso de la expresión de E-cadherina, ya que la localización de la actina en las zonas de contacto intercelular se restablecía en ambas subpoblaciones. A pesar de ello, las células de la población MCF7- β 2 presentaban una localización de actina más difusa y homogénea en toda la célula, al contrario del fenotipo observado en la población control donde la expresión de actina se detectaba de forma mayoritaria en las AJ (Figura 47).

Algunas de las hipótesis que pueden explicar a los resultados obtenidos en la línea celular de cáncer de mama MCF7- β 2 serían: i) la reducción en la actividad de Rac causa un defecto en el reciclado de la E-cadherina de la membrana, por lo que se acumularía en el citosol evitando de esta forma la relocalización en la membrana para la formación *de novo* de las AJ. ii) Los cambios observados en las estructuras de actina del citoesqueleto impiden el establecimiento de las agrupaciones de E-cadherina en la zona de los contactos. iii) Los cambios en la actividad de Rac modifican la señalización intracelular de las funciones adhesivas. En cualquier caso, existen hasta el momento multitud de estudios que relacionan la actividad de Rac con las AJ, en concreto con la E-cadherina, y el efecto que tiene sobre los procesos de desdiferenciación celular en patologías como el cáncer de mama. A pesar de ello, no se conoce el mecanismo concreto que estaría regulando esta actividad de Rac en este proceso, por lo que los resultados obtenidos en esta tesis ayudarían a clarificar este campo de estudio presentando la proteína β 2- quimerina como posible nexo de unión entre ambos procesos.

CONCLUSIONES

1. β 2-chimaerin has a dual role in ErbB2/Neu driven breast cancer. β 2-chimaerin downregulation increases both, susceptibility to develop cancer and multiplicity of preneoplastic lesions, whereas it promotes a less aggressive phenotype during tumorigenesis and reduces the incidence of lung metastasis.
2. β 2-chimaerin ablation in ErbB2/Neu breast tumors increases Rac activation but decreases tumor cell proliferation and enhances apoptotic cell death independently on cyclin D1 expression or ERK and AKT activation.
3. β 2-chimaerin expression in breast cancer cell lines reduces Rac activation and induces actin cytoskeleton rearrangements, which leads to different effects depending on the cell type. In transformed breast mesenchymal cells β 2-chimaerin may have a protective role in metastasis by decreasing cellular migration and invasion, while the expression of β 2-chimaerin in epithelial breast cancer cells results in reduced cell-cell adhesion due to inhibition of E-cadherin expression.

REFERENCIAS

1. Madaule, P. and Axel, R. A novel ras-related gene family. *Cell* **41**, 31-40 (1985).
2. Bos, J. L., Rehmann, H. and Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-77 (2007).
3. Ellenbroek, S. I. and Collard, J. G. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* **24**, 657-72 (2007).
4. Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y. L. and Mano, H. Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3029-34 (2013).
5. Lozano, E., Betson, M. and Braga, V. M. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* **25**, 452-63 (2003).
6. Caloca, M. J., Garcia-Bermejo, M. L., Blumberg, P. M., Lewin, N. E., Kremmer, E., Mischak, H., Wang, S., Nacro, K., Bienfait, B., Marquez, V. E. and Kazanietz, M. G. beta2-chimaerin is a novel target for diacylglycerol: binding properties and changes in subcellular localization mediated by ligand binding to its C1 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11854-9 (1999).
7. Caloca, M. J., Wang, H. and Kazanietz, M. G. Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of beta2-chimaerin, a 'non-protein kinase C' phorbol ester receptor. *Biochem J* **375**, 313-21 (2003).
8. Chan, A. Y., Coniglio, S. J., Chuang, Y. Y., Michaelson, D., Knaus, U. G., Philips, M. R. and Symons, M. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* **24**, 7821-9 (2005).
9. Szczepanowska, J. Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. *Acta Biochim Pol* **56**, 225-34 (2009).
10. Harmer, V. - Breast cancer: an overview. - *Nurs Times* **96**, 34-5 (2000).
11. Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. and Micklem, G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-92 (1995).
12. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. and et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71 (1994).
13. Wooster, R. and Weber, BL. - Breast and ovarian cancer. - *N Engl J Med* **5**, 2339-47 (2003)
14. Goldgar, DE, Fields P, Lewis CM, Tran TD, Cannon-Albright LA, Ward JH, Swensen J, Skolnick MH.. - A large kindred with 17q-linked breast and ovarian cancer: genetic, phenotypic. - *J Natl Cancer Inst.* **2** (1994)
15. Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, McManus R, Neuhausen SL, Ford D, Wooster R, Cannon-Albright LA, Stratton MR, Goldgar DE - Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome. - *Am J Hum Genet* **61**, 120-8 (1997)
16. Clemons, M. and Goss, P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **344**, 276-85 (2001).
17. Balmain, A. - Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse. - *Cell* **108**, 145-52 (2002)
18. Balmain, A, Gray, J, Ponder, B. - The genetics and genomics of cancer. - *Nat Gene* **33** suppl, 238-44 (2003)
19. Dunning, AM, Healey, CS, Pharoah, PD, Teare, MD, Ponder, BA, Easton, DF. - A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. - *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 843-54. (1999)

Referencias

20. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. - Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. - *Int J Cancer* **127**, 2893-91 (2010)
21. McPherson, K., Steel, C. M. and Dixon, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj* **321**, 624-8 (2000).
22. Danaei G, Ding EL, Mozaffarian D, Taylor B, Rehm J, Murray CJ, Ezzati M.- The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment. - *PLoS Med* **6** (2009)
23. Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B. - The basic pathology of human breast cancer. - *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 139-63 (2000)
24. Cardiff RD, Wellings SR.- The comparative pathology of human and mouse mammary glands.- *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **4**, 105-22 (1999)
25. Parmar H, Cunha GR.. - Epithelial-stromal interactions in the mouse and human mammary gland in vivo. - *Endocr Relat Cancer* **11**, 437-58 (2004)
26. Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM - An atlas of mouse mammary gland development. - *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 227-41 (2000)
27. Lindeman GJ, Visvader JE - Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. - *Asia Pac J Clin Oncol* **6**, 89-97 (2010)
28. Gjorevski N, Nelson CM. - Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. - *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 581-93 (2011)
29. Wiseman BS, Werb Z. - Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. - *Science* **296**, 1046-9 (2002)
30. Fantozzi A, Christofori G - Mouse models of breast cancer metastasis. - *Breast Cancer Res* **8**, (2006)
31. WD, D. and DL, P. - Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. - *N Engl J Med* **312**, 146-51(1985)
32. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. - Breast cancer metastasis: markers and models. - *Nat Rev Cancer* **5**, 591-602 (2005)
33. Elston, C. W. and Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**, 403-10 (1991).
34. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D - Molecular portraits of human breast tumours. - *Nature* **406**, 747-52 (2000)
35. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. - Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumor. -*Genome Biol* **8**, (2007)
36. Visvader JE - Cells of origin in cancer. - *Nature* **469**, 314-22 (2011)
37. Prat A, Perou CM. - Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. - *Mol Oncol* **5**, 5-23 (2011)
38. Moasser MM. - The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human. - *Oncogene* **26**, 6469-87 (2007)
39. Yarden Y, Sliwkowski MX - Untangling the ErbB signalling network. - *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-37 (2001)
40. DJ, S., GM, C., SG, W., WJ, L., A, U. and WL, M. - Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of. - *Science* **235**, 177-82 (1987)

41. Molina MA, Sáez R, Ramsey EE, Garcia-Barchino MJ, Rojo F, Evans AJ, Albanell J, Keenan EJ, Lluch A, García-Conde J, Baselga J, Clinton GM - NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated. - *Clin Cancer Res* **8**, 347-53 (2002)
42. Hendriks BS, Opresko LK, Wiley HS, Lauffenburger D - Quantitative analysis of HER2-mediated effects on HER2 and epidermal growth. - *J Biol Chem* **278**, 23343-51 (2003)
43. Ignatoski KM, Maehama T, Markwart SM, Dixon JE, Livant DL, Ethier SP. - ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human. - *Br J Cancer* **82**, 666-74 (2000)
44. Benlimame N, He Q, Jie S, Xiao D, Xu YJ, Loignon M, Schlaepfer DD, Alaoui-Jamali MA. - FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic. - *J Cell Biol* **171**, 505-16 (2005)
45. Woods Ignatoski KM, Grewal NK, Markwart S, Livant DL, Ethier SP. - p38MAPK induces cell surface alpha4 integrin downregulation to facilitate. - *Neoplasia* **5**, 128-34 (2003)
46. Chow A, Arteaga CL, Wang SE. - When tumor suppressor TGFbeta meets the HER2 (ERBB2) oncogene. - *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**, 81-8 (2011)
47. Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ - Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice. - *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10578-82 (1992)
48. McHenry PR, Vargo-Gogola T. - Pleiotropic functions of Rho GTPase signaling: a Trojan horse or Achilles' heel. - *Curr Drug Targets* **11**, 1043-58 (2010)
49. Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. - The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. - *J Cell Biol* **196**, 189-201 (2012)
50. Bar-Sagi D, Hall A.- Ras and Rho GTPases: a family reunion. - *Cell* **103**, 227-38 (2000)
51. Madaule P, Axel R. - A novel ras-related gene family. - *Cell* **41**, 31-40 (1985)
52. Hall A - Rho family GTPases. - *Biochem Soc Trans* **40**, 1378-82 (2012)
53. Fransson S, Ruusala A, Aspenström P. - The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial. - *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 500-10 (2006)
54. Ellenbroek SI, Collard JG.- Rho GTPases: functions and association with cancer. - *Clin Exp Metastasis* **24**, 657-72 (2007)
55. Aspenström P, Ruusala A, Pacholsky D. - Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho. - *Exp Cell Res* **313**, 3673-9 (2007)
56. Easton, D. F., Steele, L., Fields, P., Ormiston, W., Averill, D., Daly, P. A., McManus, R., Neuhausen, S. L., Ford, D., Wooster, R., Cannon-Albright, L. A., Stratton, M. R. and Goldgar, D. E. Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet* **61**, 120-8 (1997).
57. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A.- GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. - *Cell* **129**, 865-77 (2007)
58. Schmidt A, Hall A. - Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. - *Genes Dev* **16**, 1587-609 (2002)
59. Meller N, Merlot S, Guda C. - CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. - *J Cell Sci* **118**, 4937-46 (2005)
60. Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Tramont AC, Macara IG, Madhani H, Fink GR, Ravichandran KS - Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. - *Nat Cell Biol* **4**, 574-82 (2002)

Referencias

61. Pegtel DM, Ellenbroek SI, Mertens AE, van der Kammen RA, de Rooij J, Collard JG. - The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing. - *Curr Biol* **17**, 1623-34 (2007)
62. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. - GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. - *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-80 (2005)
63. Dunning, A. M., Healey, C. S., Pharoah, P. D., Teare, M. D., Ponder, B. A. and Easton, D. F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 843-54 (1999).
64. van Horck FP, Ahmadian MR, Haeusler LC, Moolenaar WH, Kranenburg O. - Characterization of p190RhoGEF, a RhoA-specific guanine nucleotide exchange. - *J Biol Chem* **276**, 4948-56. (2001)
65. Movilla N, Dosil M, Zheng Y, Bustelo XR. - How Vav proteins discriminate the GTPases Rac1 and RhoA from Cdc42. - *Oncogene* **20**, 8057-65 (2001)
66. Abe K, Rossman KL, Liu B, Ritola KD, Chiang D, Campbell SL, Burrridge K, Der CJ. - Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. - *J Biol Chem* **275**, 10141-9 (2000).
67. Mallon, E., Osin, P., Nasiri, N., Blain, I., Howard, B. and Gusterson, B. The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 139-63 (2000).
68. Parmar, H. and Cunha, G. R. Epithelial-stromal interactions in the mouse and human mammary gland in vivo. *Endocr Relat Cancer* **11**, 437-58 (2004).
69. Moon SY, Zheng Y. - Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. - *Trends Cell Biol* **13**, 13-22 (2003)
70. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. - Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. - *Biol Cell* **99**, 67-86 (2007).
71. Lindeman, G. J. and Visvader, J. E. Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. *Asia Pac J Clin Oncol* **6**, 89-97 (2010).
72. DerMardirossian C, Bokoch GM.- GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. - *Trends Cell Biol* **15**, 356-63 (2005)
73. Robbe K, Otto-Bruc A, Chardin P, Antony B. - Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are. - *J Biol Chem* **278**, 4756-62 (2003)
74. Guilluy C, Garcia-Mata R, Burrridge K. - Rho protein crosstalk: another social network? - *Trends Cell Biol* **21**, 718-26 (2011)
75. Ridley AJ, Hall A. - The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and. - *Cell* **70**, 389-99 (1992)
76. Mulinari S, Häcker U. - Rho-guanine nucleotide exchange factors during development: Force is nothing. - *Small GTPases* **1**, 28-43 (2010)
77. Pollard TD, Borisy GG. - Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. - *Cell* **112**, 453-65 (2003)
78. Bompard G, Caron E.. - Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. - *J Cell Biol* **166**, 957-62(2004)
79. Wallar BJ, Alberts AS.- The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. - *Trends Cell Biol* **13**, 435-46 (2003)
80. Riento K, Ridley AJ.- Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. - *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 446-56 (2003)
81. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. - Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and. - *Science* **285**, 895-8 (1999)
82. Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. - Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin. - *Nat Cell Biol* **1**, 253-9 (1999)

83. Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. - Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. - *Nat Cell Biol* **1**, 136-43 (1999)
84. Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A.- Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin. - *J Biol Chem* **276**, 1677-80 (2001)
85. Ridley AJ. - Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. - *Trends Cell Biol* **16**,522-9 (2006)
86. Hendriks, B. S., Opresko, L. K., Wiley, H. S. and Lauffenburger, D. Quantitative analysis of HER2-mediated effects on HER2 and epidermal growth factor receptor endocytosis: distribution of homo- and heterodimers depends on relative HER2 levels. *J Biol Chem* **278**, 23343-51 (2003).
87. Braga VM - Cell-cell adhesion and signalling. - *Curr Opin Cell Biol* **14**, 546-56 (2002)
88. Braga, V. M., Betson, M., Li, X. and Lamarche-Vane, N. Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol Biol Cell* **11**, 3703-21 (2000).
89. Mack, N. A., Whalley, H. J., Castillo-Lluva, S. and Malliri, A. The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle* **10**, 1571-81 (2011).
90. Hoppe AD, Swanson JA. - Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during. - *Mol Biol Cell* **15**, 3509-19 (2004)
91. Symons M, Rusk N. - Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. - *Curr Biol* **13**, 409-18 (2003)
92. Benlimame, N., He, Q., Jie, S., Xiao, D., Xu, Y. J., Loignon, M., Schlaepfer, D. D. and Alaoui-Jamali, M. A. FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. *J Cell Biol* **171**, 505-16 (2005).
93. Hall A - Rho GTPases and the actin cytoskeleton. - *Science* **279**, 509-14 (1998)
94. Kim SK. - Cell polarity: new PARTners for Cdc42 and Rac. - *Nat Cell Biol* **2**, 143-5 (2000)
95. Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. - The role of the Rho GTPases in neuronal development. - *Genes Dev* **19**, 1-49 (2005)
96. Militello R, Colombo MI.- Small GTPases as regulators of cell division. - *Commun Integr Biol* **6** (2013)
97. Sahai E, Marshall CJ- RHO-GTPases and cancer. - *Nat Rev Cancer* **2**, 133-42 (2002)
98. Velaithan R, Kang J, Hirpara JL, Loh T, Goh BC, Le Bras M, Brenner C, Clement MV, Pervaiz S - The small GTPase Rac1 is a novel binding partner of Bcl-2 and stabilizes its. - *Blood* **117**, 6214-26 (2011)
99. Klein EA, Yang C, Kazanietz MG, Assoian RK.- NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. - *Cell Cycle* **6**, 1115-21 (2007)
100. Shaulian E, Karin M.- AP-1 in cell proliferation and survival. - *Oncogene* **20**, 2390-400 (2001)
101. Eblen ST, Slack JK, Weber MJ, Catling AD. - Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK). - *Mol Cell Biol* **22**, 6023-33 (2002)
102. Hill, C. S., Wynne, J. and Treisman, R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-70 (1995).
103. Cammarano MS, Minden A. - Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent. - *J Biol Chem* **276**, 25876-82 (2001)
104. Marinissen MJ, Chiariello M, Gutkind JS. - Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma). - *Genes Dev* **15**, 535-53(2001)
105. Coleman ML, Olson MF. - Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with. - *Cell Death Differ* **9**, 493-504 (2002)

Referencias

106. Archer H, Bar-Sagi D. - Ras and Rac as activators of reactive oxygen species (ROS). - *Methods Mol Biol* **189**, 67-73 (2002)
107. Prendergast GC. - Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. - *Nat Rev Cancer* **1**, 162-8 (2001)
108. Subauste MC, Von Herrath M, Benard V, Chamberlain CE, Chuang TH, Chu K, Bokoch GM, Hahn KM. - Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes. - *J Biol Chem* **275**, 9725-33 (2000)
109. Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szasz, A. M., Wang, Z. C., Brock, J. E., Richardson, A. L. and Weinberg, R. A. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* **137**, 1032-46 (2009).
110. Kleer, C. G., Griffith, K. A., Sabel, M. S., Gallagher, G., van Golen, K. L., Wu, Z. F. and Merajver, S. D. RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat* **93**, 101-10 (2005).
111. Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M. and Kaina, B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* **87**, 635-44 (2002).
112. 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. - *Oncogene* **19**, 3013-20 (2000)
113. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. - rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. - *J Biol Chem* **264**, 16378-82 (1999)
114. Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. - Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. - *J Biol Chem* **272**, 20384-8 (1997)
115. Haataja, L., Groffen, J. and Heisterkamp, N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* **272**, 20384-8 (1997).
116. Yu H, Leitenberg D, Li B, Flavell RA - Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation. - *J Exp Med* **194**, 915-26 (2001)
117. Abdel-Latif D, Steward M, Lacy P. - Neutrophil primary granule release and maximal superoxide generation depend on. - *Can J Physiol Pharmacol* **83**, 69-75 (2005)
118. Roberts AW, Kim C, Zhen L, Lowe JB, Kapur R, Petryniak B, Spaetti A, Pollock JD, Borneo JB, Bradford GB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Williams DA. - Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is. - *Immunity* **10**, 183-96 (1999)
119. Kinsella BT, Erdman RA, Maltese WA.. - Posttranslational modification of Ha-ras p21 by farnesyl versus geranylgeranyl. - *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8934-8 (1991)
120. Sosa MS, Lopez-Haber C, Yang C, Wang H, Lemmon MA, Busillo JM, Luo J, Benovic JL, Klein-Szanto A, Yagi H, Gutkind JS, Parsons RE, Kazanietz MG.. - Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling. - *Mol Cell* **40**, 877-92 (2010)
121. Caloca MJ, Wang H, Kazanietz MG. - Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of. - *Biochem J* **375**, 313-21 (2003)
122. Wang H, Yang C, Leskow FC, Sun J, Canagarajah B, Hurley JH, Kazanietz MG. - Phospholipase Cgamma/diacylglycerol-dependent activation of beta2-chimaerin. - *EMBO J* **25**, 2062-74 (2006)
123. Zhang B, Gao Y, Moon SY, Zhang Y, Zheng Y.- Oligomerization of Rac1 gtpase mediated by the carboxyl-terminal polybasic. - *J Biol Chem* **276**, 8958-67 (2001)
124. Zhang B, Zhang Y, Collins CC, Johnson DI, Zheng Y. - A built-in arginine finger triggers the self-stimulatory GTPase-activating. - *J Biol Chem* **274**, 2609-12 (1999)

125. Visvikis O, Lorès P, Boyer L, Chardin P, Lemichez E, Gacon G. - Activated Rac1, but not the tumorigenic variant Rac1b, is ubiquitinated on Lys. - *FEBS J.* **275**, 386-96 (2008)
126. Castillo-Lluva S, Tatham MH, Jones RC, Jaffray EG, Edmondson RD, Hay RT, Malliri A. - SUMOylation of the GTPase Rac1 is required for optimal cell migration. - *Nat Cell Biol* **12**, 1078-85 (2010)
127. Zhang B, Zhang Y, Shacter E - Caspase 3-mediated inactivation of rac GTPases promotes drug-induced apoptosis in. - *Mol Cell Biol* **23**, 5716-25 (2003)
128. Zhang B, Zhang Y, Dagher MC, Shacter E.- Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced. - *Cancer Res* **65**, 6054-62 (2005)
129. Sun D, Xu D, Zhang B. - Rac signaling in tumorigenesis and as target for anticancer drug development. - *Drug Resist Updat* **9**, 274-87(2006)
130. Wertheimer E, Gutierrez-Uzquiza A, Rosembliit C, Lopez-Haber C, Sosa MS, Kazanietz MG. - Rac signaling in breast cancer: a tale of GEFs and GAPs. - *Cell Signal* **24**, 353-62 (2012)
131. Bokoch GM. - Biology of the p21-activated kinases. - *Annu Rev Biochem* **72**, 743-81 (2003)
132. Szczepanowska J. - Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. - *Acta Biochim Pol* **56**, 225-34 (2009)
133. Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW. - Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. - *Nature* **418**, 790-3 (2002)
134. Steffen, A., Koestler, S. A. and Rottner, K. Requirements for and consequences of Rac-dependent protrusion. *Eur J Cell Biol* **93**, 184-93 (2014)
135. Mack NA, Whalley HJ, Castillo-Lluva S, Malliri A.- The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. - *Cell Cycle* **10**, 1571-81 (2011)
136. Nelson WJ, Dickinson DJ, Weis WI. - Roles of cadherins and catenins in cell-cell adhesion and epithelial cell. - *Prog Mol Biol Transl Sci* **116** (2013)
137. Lozano E, Betson M, Braga VM. - Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. - *Bioessays* **25**, 452-63 (2003)
138. Baum, B. and Georgiou, M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* **192**, 907-17 (2011).
139. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12 (1999).
140. Klein, E. A., Yang, C., Kazanietz, M. G. and Assoian, R. K. NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. *Cell Cycle* **6**, 1115-21 (2007).
141. Michaelson, D., Abidi, W., Guardavaccaro, D., Zhou, M., Ahearn, I., Pagano, M. and Philips, M. R. Rac1 accumulates in the nucleus during the G2 phase of the cell cycle and promotes cell division. *J Cell Biol* **181**, 485-96 (2008).
142. Halet, G. and Carroll, J. Rac activity is polarized and regulates meiotic spindle stability and anchoring in mammalian oocytes. *Dev Cell* **12**, 309-17 (2007).
143. Chaigne-Delalande B, Anies G, Kramer I, Genot E. - Nonadherent cells switch to a Rac-mediated, SHIP regulated, Akt activation mode. - *Oncogene* **27**, 1876-85 (2008)
144. Jaffe, A. B. and Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-69 (2005).
145. Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A. - Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase. - *Science* **265**, 531-3. (1994)
146. Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA, Hirshberg M, Lambeth JD. - Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector. - *J Biol Chem* **272**, 18834-41 (1997)

Referencias

147. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW.- Activation of NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. -*Nature* **353**, 668-70 (1991)
148. Moldovan L, Mythreya K, Goldschmidt-Clermont PJ, Satterwhite LL. - Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H. - *Cardiovasc Res* **71**, 236-46 (2006)
149. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, Leake D, Godden EL, Albertson DG, Nieto MA, Werb Z, Bissell MJ. - Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic. - *Nature* **436**, 123-7 (2005)
150. Ueda S, Kataoka T, Satoh T - Activation of the small GTPase Rac1 by a specific guanine-nucleotide-exchange. - *Biol Cell* **100**, 645-57 (2008)
151. Chiu, T. T., Jensen, T. E., Sylow, L., Richter, E. A. and Klip, A. Rac1 signalling towards GLUT4/glucose uptake in skeletal muscle. *Cell Signal* **23**, 1546-54 (2011).
152. Hanahan D, Weinberg RA. - Hallmarks of cancer: the next generation. - *Cell* **144**, 646-74 (2011)
153. Balda MS, Matter K- Transmembrane proteins of tight junctions. - *Semin Cell Dev Biol.* **11**, 281-9 (2000)
154. Braga V. - Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. - *Exp Cell Res* **261**, 83-90 (2000)
155. Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA. - The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of. - *J Cell Biol* **137**, 1421-31(1997)
156. Noren NK, Niessen CM, Gumbiner BM, Burrige K. - Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. - *J Biol Chem* **276**, 33305-8 (2001)
157. Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y. - Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. - *J Cell Biol* **139**, 1047-59 (1997)
158. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. - Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. - *Cell* **135**, 510-23 (2008)
159. Rooney, C., White, G., Nazgiewicz, A., Woodcock, S. A., Anderson, K. I., Ballestrem, C. and Malliri, A. The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO Rep* **11**, 292-8.
160. Ridley AJ. - Rho proteins and cancer. - *Breast Cancer Res Treat* **84**, 13-9 (2004)
161. Stallings-Mann ML, Waldmann J, Zhang Y, Miller E, Gauthier ML, Visscher DW, Downey GP, Radisky ES, Fields AP, Radisky DC. - Matrix metalloproteinase induction of Rac1b, a key effector of lung cancer. - *Sci Transl Med.* **4** (2012)
162. Fryer BH, Field J.- Rho, Rac, Pak and angiogenesis: old roles and newly identified responsibilities. - *Cancer Lett* **229**, 13-23(2005)
163. Tan, W., Palmby, T. R., Gavard, J., Amornphimoltham, P., Zheng, Y. and Gutkind, J. S. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB J* **22**, 1829-38 (2008).
164. Soga N, Namba N, McAllister S, Cornelius L, Teitelbaum SL, Dowdy SF, Kawamura J, Hruska KA. - Rho family GTPases regulate VEGF-stimulated endothelial cell motility. - *Exp Cell Res* **269**, 73-87 (2001)
165. Hirota K, Semenza GL.- Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1. - *J Biol Chem* **276**, 21166-72 (2001)
166. Turcotte S, Desrosiers RR, Beliveau R. - Hypoxia upregulates von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein through. - *Am J Physiol Renal Physiol.* **286**, 338-48 (2004)
167. Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y. L. and Mano, H. Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3029-34 (2013).

168. 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. - *Br J Cancer* **87**, 635-44 (2002)
169. Mira JP, Benard V, Groffen J, Sanders LC, Knaus UG - Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a. - *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 185-9 (2000)
170. 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. - *Clin Cancer Res* **10**, 4799-805 (2004)
171. Orlichenko L, Geyer R, Yanagisawa M, Khauv D, Radisky ES, Anastasiadis PZ, Radisky DC- The 19-amino acid insertion in the tumor-associated splice isoform Rac1b confers. - *J Biol Chem* **285**, 19153-61 (2010)
172. Fiegen D, Haeusler LC, Blumenstein L, Herbrand U, Dvorsky R, Vetter IR, Ahmadian MR. - Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. - *J Biol Chem* **279**, 4743-9 (2004)
173. Matos P, Collard JG, Jordan P. - Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP. - *J Biol Chem* **278**, 50442-8 (2003)
174. Nimnual AS, Taylor LJ, Nyako M, Jeng HH, Bar-Sagi D. - Perturbation of cytoskeleton dynamics by the opposing effects of Rac1 and Rac1b. - *Small GTPases* **1**, 89-97 (2010)
175. Matos P, Jordan P. - Increased Rac1b expression sustains colorectal tumor cell survival. - *Mol Cancer Res.* **6**, 1178-84 (2008)
176. Lee, K., Chen, Q. K., Lui, C., Cichon, M. A., Radisky, D. C. and Nelson, C. M. Matrix compliance regulates Rac1b localization, NADPH oxidase assembly, and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* **23**, 4097-108 (2012)
177. Minard ME, Kim LS, Price JE, Gallick GE. - The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration. - *Breast Cancer Res Treat* **84**, 21-32 (2004)
178. Zheng M, Simon R, Mirlacher M, Maurer R, Gasser T, Forster T, Diener PA, Mihatsch MJ, Sauter G, Schraml P - TRIO amplification and abundant mRNA expression is associated with invasive tumor. - *Am J Pathol* **165**, 63-9 (2004)
179. Citterio C, Menacho-Márquez M, García-Escudero R, Larive RM, Barreiro O, Sánchez-Madrid F, Paramio JM, Bustelo XR. - The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific. - *Sci Signal* **5**, (2012)
180. Lahoz, A. and Hall, A. A tumor suppressor role for srGAP3 in mammary epithelial cells. *Oncogene* **32**, 4854-60 (2013)
181. Yang C, Liu Y, Leskow FC, Weaver VM, Kazanietz MG. - Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by. - *J Biol Chem* **280**, 24363-70 (2005)
182. Hall C, Monfries C, Smith P, Lim HH, Kozma R, Ahmed S, Vanniasingham V, Leung T, Lim L.- Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase C and BCR, the product of the breakpoint cluster region gene. - *J Mol Biol* **211**, 11-6 (1990)
183. Hall C, Sin WC, Teo M, Michael GJ, Smith P, Dong JM, Lim HH, Manser E, Spurr NK, Jones TA, et al.- Alpha 2-chimerin, an SH2-containing GTPase-activating protein for the ras-related.- *Mol Cell Biol* **13**, 4986-98 (1993)
184. Leung T, How BE, Manser E, Lim L - Germ cell beta-chimaerin, a new GTPase-activating protein for p21rac, is. - *J Biol Chem* **268**, 3813-6 (1993)
185. Yang C, Kazanietz MG. - Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein. - *Biochem J* **403**, 1-12 (2007)

Referencias

186. Zubeldia-Brenner L, Gutierrez-Uzquiza A, Barrio-Real L, Wang H, Kazanietz MG, Leskow FC. - beta3-Chimaerin, a novel member of the chimaerin Rac-GAP family. - *Mol Biol Rep* **41**, 2067-76 (2014)
187. Ahmed S, Kozma R, Lee J, Monfries C, Harden N, Lim L. -The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C - *Biochem J* **280**, 233-41 (1991)
188. Areces LB, Kazanietz MG, Blumberg PM.- Close similarity of baculovirus-expressed n-chimaerin and protein kinase C alpha.- *J Biol Chem.* **269**, 19553-8 (1994)
189. Kazanietz MG. - Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. - *Mol Pharmacol* **61**, 759-67 (2002)
190. Brose N, Betz A, Wegmeyer H- Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway. - *Curr Opin Neurobiol* **14**, 328-40 (2004)
191. Hall C, Lim L, Leung T. - C1, see them all. - *Trends Biochem Sci* **30**, 169-71 (2005)
192. Caloca MJ, Wang H, Delemos A, Wang S, Kazanietz MG. - Phorbol esters and related analogs regulate the subcellular localization of beta. - *J Biol Chem* **276**, 18303-12 (2001)
193. Canagarajah B, Leskow FC, Ho JY, Mischak H, Saidi LF, Kazanietz MG, Hurley JH. - Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP. - *Cell* **119**, 407-18 (2004)
194. Ahmed S, Lee J, Kozma R, Best A, Monfries C, Lim L. - A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic. - *J Biol Chem* **268**, 10709-12 (1993)
195. Leung T, How BE, Manser E, Lim L. - Cerebellar beta 2-chimaerin, a GTPase-activating protein for p21 ras-related rac. - *J Biol Chem* **269**, 12888-92 (1994)
196. Hall C, Michael GJ, Cann N, Ferrari G, Teo M, Jacobs T, Monfries C, Lim L. - alpha2-chimaerin, a Cdc42/Rac1 regulator, is selectively expressed in the rat. - *J Neurosci.* **21**, 5191-202 (2001)
197. Kai M, Yasuda S, Imai S, Kanoh H, Sakane F. - Tyrosine phosphorylation of beta2-chimaerin by Src-family kinase negatively. - *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1407-15 (2007)
198. Caloca MJ, Fernandez N, Lewin NE, Ching D, Modali R, Blumberg PM, Kazanietz MG. - Beta2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor. - *J Biol Chem* **272**, 26488-96 (1997)
199. Colón-González F, Leskow FC, Kazanietz MG. - Identification of an autoinhibitory mechanism that restricts C1 domain-mediated. - *J Biol Chem.* **283**, 35247-57 (2008)
200. Griner EM, Caino MC, Sosa MS, Colón-González F, Chalmers MJ, Mischak H, Kazanietz MG. - A novel cross-talk in diacylglycerol signaling: the Rac-GAP beta2-chimaerin is. - *J Biol Chem.* **285**, 16931-41 (2010)
201. Irby RB, Yeatman TJ. - Role of Src expression and activation in human cancer. - *Oncogene.* **19**, 5636-42 (2000)
202. Sánchez-Bailón MP, Calcabrini A, Gómez-Domínguez D, Morte B, Martín-Forero E, Gómez-López G, Molinari A, Wagner KU, Martín-Pérez J. - Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and. - *Cell Signal.* **24**, 1276-86 (2012)
203. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. and AR, H. - Cell migration: integrating signals from front to back. - *Science.* **302**, 1704-9 (2003)
204. Siliceo M, Mérida I. - T cell receptor-dependent tyrosine phosphorylation of beta2-chimaerin modulates. - *J Biol Chem.* **284**, 11354-63 (2009)

205. Shi L, Fu WY, Hung KW, Porchetta C, Hall C, Fu AK, Ip NY. - Alpha2-chimaerin interacts with EphA4 and regulates EphA4-dependent growth cone. - *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 16347-52 (2007)
206. Takeuchi S, Yamaki N, Iwasato T, Negishi M, Katoh H.- Beta2-chimaerin binds to EphA receptors and regulates cell migration. **583**, 1237-42 (2009)
207. Ridley AJ. - Rho GTPases and cell migration. - *J Cell Sci*. **114**, 2713-22 (2001)
208. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. - Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. - *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2305-9 (1994)
209. Buttery P, Beg AA, Chih B, Broder A, Mason CA, Scheiffele P. - The diacylglycerol-binding protein alpha1-chimaerin regulates dendritic. - *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 1924-9 (2006)
210. Wang H, Kazanietz MG. - Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with. - *J Biol Chem*. **277**, 4541-50 (2002)
211. Brown M, Jacobs T, Eickholt B, Ferrari G, Teo M, Monfries C, Qi RZ, Leung T, Lim L, Hall C. - Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin. - *J Neurosci*. **24**, 8994-9004 (2004)
212. Van de Ven TJ, VanDongen HM, VanDongen AM.- The non kinase phorbol ester receptor alpha1-chimerin bind the NMDA receptor- *J Neurosci*. **25**, 9488-96 (2005)
213. Gutierrez-Uzquiza A, Colon-Gonzalez F, Leonard TA, Canagarajah BJ, Wang H, Mayer BJ, Hurley JH, Kazanietz MG. - Coordinated activation of the Rac-GAP beta2-chimaerin by an atypical proline-rich. - *Nat Commun*. **4**, (2013)
214. Wegmeyer H, Egea J, Rabe N, Gezelius H, Filosa A, Enjin A, Varoqueaux F, Deininger K, Schnütgen F, Brose N, Klein R, Kullander K, Betz A. - EphA4-dependent axon guidance is mediated by the RacGAP alpha2-chimaerin. - *Neuron* **55**, 756-67 (2007)
215. Lim HH, Michael GJ, Smith P, Lim L, Hall C.- Developmental regulation and neuronal expression of the mRNA of rat n-chimerin.- *Biochem J*. **287**, 415-22 (1992)
216. Clark C, Austen O, Poparic I, Guthrie S.- alpha2-Chimaerin regulates a key axon guidance transition during development of. - *J Neurosci*. **33**, 16540-51 (2013)
217. Vanderhaeghen, P. and Cheng, H. J. Guidance molecules in axon pruning and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, (2010).
218. Riccomagno, M. M., Hurtado, A., Wang, H., Macopson, J. G., Griner, E. M., Betz, A., Brose, N., Kazanietz, M. G. and Kolodkin, A. L. The RacGAP beta2-Chimaerin selectively mediates axonal pruning in the hippocampus. *Cell* **149**, 1594-606 (2012).
219. Siliceo M, García-Bernal D, Carrasco S, Díaz-Flores E, Coluccio Leskow F, Teixidó J, Kazanietz MG, Mérida I.- Beta2-chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of. - *J Cell Sci. Jan* **119**, 141-52 (2006)
220. Caloca, M. J., Delgado, P., Alarcon, B. and Bustelo, X. R. Role of chimaerins, a group of Rac-specific GTPase activating proteins, in T-cell receptor signaling. *Cell Signal* **20**, 758-70 (2008).
221. Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS. - Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. - *Nat Rev Immunol*. **7**, 131-43 (2007)
222. Leskow FC, Holloway BA, Wang H, Mullins MC, Kazanietz MG. - The zebrafish homologue of mammalian chimerin Rac-GAPs is implicated in epiboly. - *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 5373-8 (2006)
223. Bruinsma SP, Cagan RL, Baranski TJ. - Chimaerin and Rac regulate cell number, adherens junctions, and ERK MAP kinase. - *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 7098-103 (2007)
224. Miyake, N., Chilton, J., Psatha, M., Cheng, L., Andrews, C., Chan, W. M., Law, K., Crosier, M., Lindsay, S., Cheung, M., Allen, J., Gutowski, N. J., Ellard, S., Young, E., Iannaccone, A., Appukuttan, B., Stout, J. T., Christiansen, S., Ciccarelli, M. L., Baldi,

Referencias

- A., Campioni, M., Zenteno, J. C., Davenport, D., Mariani, L. E., Sahin, M., Guthrie, S. and Engle, E. C. Human CHN1 mutations hyperactivate alpha2-chimaerin and cause Duane's retraction syndrome. *Science* **321**, 839-43 (2008).
225. Suliman, S. G., Stanik, J., McCulloch, L. J., Wilson, N., Edghill, E. L., Misovicova, N., Gasperikova, D., Sandrikova, V., Elliott, K. S., Barak, L., Ellard, S., Volpi, E. V., Klimes, I. and Gloyn, A. L. Severe insulin resistance and intrauterine growth deficiency associated with haploinsufficiency for INSR and CHN2: new insights into synergistic pathways involved in growth and metabolism. *Diabetes* **58**, 2954-61 (2009).
226. Yuan S, Miller DW, Barnett GH, Hahn JF, Williams BR - Identification and characterization of human beta 2-chimaerin: association with. - *Cancer Res.* **55**, 3456-61 (1995)
227. Gyorffy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q. and Szallasi, Z. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* **123**, 725-31 (2010).
228. Menna PL, Skilton G, Leskow FC, Alonso DF, Gomez DE, Kazanietz MG. - Inhibition of aggressiveness of metastatic mouse mammary carcinoma cells by the. - *Cancer Res.* **63**, 2284-91 (2003)
229. Yang C, Liu Y, Lemmon MA, Kazanietz MG. - Essential role for Rac in heregulin beta1 mitogenic signaling: a mechanism that. - *Mol Cell Biol.* **26**, 831-42 (2006)
230. Bruinsma SP, Baranski TJ. - Beta2-chimaerin in cancer signaling: connecting cell adhesion and MAP kinase. - *Cell Cycle.* **6**, 2440-4 (2007)
231. Guy, C. T., Webster, M. A., Schaller, M., Parsons, T. J., Cardiff, R. D. and Muller, W. J. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10578-82 (1992).
232. Cramer, E. P., Glenthoj, A., Hager, M., Juncker-Jensen, A., Engelholm, L. H., Santoni-Rugiu, E., Lund, L. R., Laerum, O. D., Cowland, J. B. and Borregaard, N. No effect of NGAL/lipocalin-2 on aggressiveness of cancer in the MMTV-PyMT/FVB/N mouse model for breast cancer. *PLoS One* **7**, e39646 (2012).
233. Laird, A. K. Dynamics of tumour growth: comparison of growth rates and extrapolation of growth curve to one cell. *Br J Cancer* **19**, 278-91 (1965).
234. Landis, M. W., Pawlyk, B. S., Li, T., Sicinski, P. and Hinds, P. W. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* **9**, 13-22 (2006).
235. Bowe, D. B., Kenney, N. J., Adereth, Y. and Maroulakou, I. G. Suppression of Neu-induced mammary tumor growth in cyclin D1 deficient mice is compensated for by cyclin E. *Oncogene* **21**, 291-8 (2002).
236. Moasser, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**, 6469-87 (2007).
237. Schlessinger, J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* **306**, 1506-7 (2004).
238. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-37 (2001).
239. Marshall, C. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* **11**, 732-6 (1999).
240. Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J. and Roussel, M. F. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1091-6 (1998).

241. Kawada, M., Yamagoe, S., Murakami, Y., Suzuki, K., Mizuno, S. and Uehara, Y. Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* **15**, 629-37 (1997).
242. Bruinsma, S. P., Cagan, R. L. and Baranski, T. J. Chimaerin and Rac regulate cell number, adherens junctions, and ERK MAP kinase signaling in the Drosophila eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7098-103 (2007).
243. Menna, P. L., Parera, R. L., Cardama, G. A., Alonso, D. F., Gomez, D. E. and Farina, H. G. Enhanced cytostatic activity of statins in mouse mammary carcinoma cells overexpressing beta2-chimaerin. *Mol Med Rep* **2**, 97-102 (2009).
244. Chaigne-Delalande, B., Anies, G., Kramer, I. and Genot, E. Nonadherent cells switch to a Rac-mediated, SHIP regulated, Akt activation mode for survival. *Oncogene* **27**, 1876-85 (2008).
245. Zhang, B., Zhang, Y. and Shacter, E. Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75. *Mol Cell Biol* **24**, 6205-14 (2004).
246. Jin, S., Ray, R. M. and Johnson, L. R. Rac1 mediates intestinal epithelial cell apoptosis via JNK. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G1137-47 (2006).
247. Joneson, T. and Bar-Sagi, D. Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol Cell Biol* **19**, 5892-901 (1999).
248. Yang, C., Klein, E. A., Assoian, R. K. and Kazanietz, M. G. Heregulin beta1 promotes breast cancer cell proliferation through Rac/ERK-dependent induction of cyclin D1 and p21Cip1. *Biochem J* **410**, 167-75 (2008).
249. Sun, D., Xu, D. and Zhang, B. Rac signaling in tumorigenesis and as target for anticancer drug development. *Drug Resist Updat* **9**, 274-87 (2006).
250. Leskow, F. C., Holloway, B. A., Wang, H., Mullins, M. C. and Kazanietz, M. G. The zebrafish homologue of mammalian chimerin Rac-GAPs is implicated in epiboly progression during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5373-8 (2006).
251. Fournier, A. K., Campbell, L. E., Castagnino, P., Liu, W. F., Chung, B. M., Weaver, V. M., Chen, C. S. and Assoian, R. K. Rac-dependent cyclin D1 gene expression regulated by cadherin- and integrin-mediated adhesion. *J Cell Sci* **121**, 226-33 (2008).
252. Palen, K. A., Jing, W., Weber, J. J., Tilkens, S. B., Chan, A. M., Johnson, B. D. and Gershan, J. A. Separation and Characterization of Epithelial and Mesenchymal-like Murine Mammary Tumor Cells Reveals Epithelial Cell Differentiation Plasticity and Enhanced Tumorigenicity of Epithelial-enriched Tumor Cells. *Cancer Microenviron* **6**, 79-89 (2013).
253. Liu, J. C., Deng, T., Lehal, R. S., Kim, J. and Zacksenhaus, E. Identification of tumorsphere- and tumor-initiating cells in HER2/Neu-induced mammary tumors. *Cancer Res* **67**, 8671-81 (2007).
254. Cardiff, R. D., Bern, H. A., Faulkin, L. J., Daniel, C. W., Smith, G. H., Young, L. J., Medina, D., Gardner, M. B., Wellings, S. R., Shyamala, G., Guzman, R. C., Rajkumar, L., Yang, J., Thordarson, G., Nandi, S., MacLeod, C. L., Oshima, R. G., Man, A. K., Sawai, E. T., Gregg, J. P., Cheung, A. T. and Lau, D. H. Contributions of mouse biology to breast cancer research. *Comp Med* **52**, 12-31 (2002).
255. Adam, L., Vadlamudi, R. K., McCrea, P. and Kumar, R. Tiam1 overexpression potentiates heregulin-induced lymphoid enhancer factor-1/beta -catenin nuclear signaling in breast cancer cells by modulating the intercellular stability. *J Biol Chem* **276**, 28443-50 (2001).

Referencias

256. Sivaraman, V. S., Wang, H., Nuovo, G. J. and Malbon, C. C. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* **99**, 1478-83 (1997).
257. Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M. D. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**, 4619-28 (2004).
258. Bruinsma, S. P. and Baranski, T. J. Beta2-chimaerin in cancer signaling: connecting cell adhesion and MAP kinase activation. *Cell Cycle* **6**, 2440-4 (2007).
259. Yang, C., Liu, Y., Leskow, F. C., Weaver, V. M. and Kazanietz, M. G. Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by {beta}2-chimerin. *J Biol Chem* **280**, 24363-70 (2005).
260. Yang, C., Liu, Y., Lemmon, M. A. and Kazanietz, M. G. Essential role for Rac in heregulin beta1 mitogenic signaling: a mechanism that involves epidermal growth factor receptor and is independent of ErbB4. *Mol Cell Biol* **26**, 831-42 (2006).
261. Steffen, A., Koestler, S. A. and Rottner, K. Requirements for and consequences of Rac-dependent protrusion. *Eur J Cell Biol* (2014).
262. Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia. *Mol Cell Biol* **16**, 5069-80 (1996).
263. Menna, P. L., Skilton, G., Leskow, F. C., Alonso, D. F., Gomez, D. E. and Kazanietz, M. G. Inhibition of aggressiveness of metastatic mouse mammary carcinoma cells by the beta2-chimaerin GAP domain. *Cancer Res* **63**, 2284-91 (2003).
264. Hotchin, N. A. and Hall, A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* **131**, 1857-65 (1995).
265. Malliri A, van Es S, Huveneers S, Collard JG. - The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance. - *J Biol Chem.* **279**, 30092-8 (2004)
266. Herrera, R. and Shivers, B. D. Expression of alpha 1-chimaerin (rac-1 GAP) alters the cytoskeletal and adhesive properties of fibroblasts. *J Cell Biochem* **56**, 582-91 (1994).
267. Maeda, M., Kato, S., Fukushima, S., Kaneyuki, U., Fujii, T., Kazanietz, M. G., Oshima, K. and Shigemori, M. Regulation of vascular smooth muscle proliferation and migration by beta2-chimaerin, a non-protein kinase C phorbol ester receptor. *Int J Mol Med* **17**, 559-66 (2006).
268. Takeuchi, S., Yamaki, N., Iwasato, T., Negishi, M. and Katoh, H. Beta2-chimaerin binds to EphA receptors and regulates cell migration. *FEBS Lett* **583**, 1237-42 (2009).
269. Menna, P. L., Peche, L. Y., Alonso, D. F. and Gomez, D. E. Role of beta2-chimaerin in the behaviour of murine mammary carcinoma cells in response to extracellular matrix components. *Int J Mol Med* **15**, 91-5 (2005).
270. Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, A. and Hotchin, N. A. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* **137**, 1421-31 (1997).
271. Fukata, M. and Kaibuchi, K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 887-97 (2001).
272. Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N. and Kaibuchi, K. Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci* **114**, 1829-38 (2001).
273. Breier, G., Grosser, M. and Rezaei, M. Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res* **355**, 523-7 (2014).

274. Ehrlich, J. S., Hansen, M. D. and Nelson, W. J. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* **3**, 259-70 (2002).
275. Jou, T. S. and Nelson, W. J. Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J Cell Biol* **142**, 85-100 (1998).
276. Yap, A. S., Briehner, W. M., Pruschy, M. and Gumbiner, B. M. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol* **7**, 308-15 (1997).
277. Gumbiner, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-57 (1996).