



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

**DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE VÍAS DE
SEÑALIZACIÓN EN CÁNCER DE MAMA**

Agustín González Burnhauser – LU 1036915
Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. Eva Wertheimer
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET
Facultad de Medicina, UBA.

Co-Tutor:

Dr. Federico Prada
Fundación UADE.

Marzo 30, 2017

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia me gustaría agradecer a mi familia. Mis padres Osvaldo y María Eugenia, y mis hermanas Josefina y Guadalupe. Cada uno de ellos, ejemplo de esfuerzo, constancia y de amor, supieron construir un entorno ideal en el cual crecer, aprender y disfrutar. Gracias por acompañarme, guiarme e incentivar me en cada etapa de mi vida. Cada uno desde su lugar, con consejos, mates, charlas y risas, hicieron posible que yo pueda transitar este lindo pero duro camino universitario. Son mi orgullo.

A los amigos y gente querida que me dio la vida. Particularmente a Fran, amigo de la infancia con el que hemos compartido infinitas charlas acerca de nuestro futuro; Mili, vecina, amiga y colega; al “dream team” y a tantas otras personas que me han acompañado en algún momento de este camino y que están ahora cerca o un poco más lejos... gracias!

A la profesora “Marita” Cócaro que con su entusiasmo y trabajo duro inculcó en mí el amor por la biología, gracias eternas, siempre te recordaré. Al Dr. Alberto D’ Andrea que dedicó su tiempo a disipar cada duda que tenía sobre la carrera antes de comenzar. Al Dr. Federico Prada que con sus primeras clases de la carrera me hizo entender la magnitud de las ciencias biológicas, gracias por estar siempre a un mail de distancia. A la Dra. Eva Wertheimer por abrirme las puertas de su laboratorio y ser mi mentora durante estos dos años y medio, gracias por los conocimientos adquiridos en esta etapa. Para ella mi cariño y mi respeto.

Al resto de AFE 112. Ángela, excelente compañera, me alegra mucho haberme formado junto a vos, gracias por la paciencia infinita. A la Dra Andrea de Laurentiis y al Dr Fernando Correa por haber compartido su espacio conmigo y haberme ayudado de forma desinteresada cada vez que lo necesité, gracias por su paciencia y su buena onda.

Por último me gustaría agradecer a todo el CEFyBO, por recibirme, y brindar su ayuda y conocimientos, y al Instituto Nacional del Cáncer (Ministerio de Salud de la Nación), por haberme otorgado la beca de investigación en cáncer para estudiantes avanzados, que hizo posible dedicarle más tiempo a mi trabajo en el laboratorio.

Muchas gracias!

RESUMEN

La activación de receptores ErbB por ligandos como las heregulinas (HRG) promueve una fuerte activación de Rac1 en células de cáncer de mama. Rac1 es una Rho GTPasa implicada en motilidad celular, mitogenesis, transformación y metástasis. Es activada por factores intercambiadores de nucleótidos guanina (GEFs). En particular, el P-Rex1 es un GEF de Rac esencial para la migración inducida por HRG y está altamente sobreexpresado en cáncer de mama humano y en líneas celulares de tipo luminal. Antecedentes del laboratorio obtenidos a partir del análisis de un *microarray* de ADNc indicarían que TGFβ2, un potente regulador del crecimiento celular y de la migración, aumenta su expresión ante un estímulo de 6 horas con HRG. Dicho aumento sería dependiente de P-Rex1. La desregulación de las vías de señalización de TGFβ/SMAD están implicadas en cáncer. El mecanismo por el cual TGFβ actúa a medida de que las células adquieren la capacidad de invadir y hacer metástasis aún no ha sido dilucidado. El objetivo general de este trabajo fue desarrollar las estrategias experimentales necesarias para estudiar el efecto sobre la progresión del cáncer de mama del aumento en la expresión de TGFβ2 producido por los receptores ErbB. Los objetivos específicos eran: 1) Poner a punto la técnica de *pull-down* para medir Rac activado en células T-47D, 2) Determinar las condiciones necesarias para medir niveles de ARN mensajero (ARNm) de TGFβ2 por PCR en tiempo real (Q-PCR) y 3) Evaluar la temporalidad de la activación de Rac y del aumento de TGFβ2 inducidos por HRG. En este trabajo se logró expresar y purificar la proteína recombinante GST-PBD, necesaria para los ensayos de *pull-down* de Rac1 activado, y poner a punto la cantidad óptima por ensayo para visualizar diferencias de activación de Rac entre los tratamientos. Al realizar curvas de tiempo con estímulos de HRG en células T-47D, observamos una activación de Rac1 con un pico a los 5 minutos que decrece hacia las 6 horas de estimulación. Por otro lado, se diseñaron *primers* específicos para TGFβ2 y un gen de referencia 18S, que probaron ser eficientes para ser usados en reacciones de Q-PCR. Los niveles de ARNm de TGFβ2 aumentan 3 veces con un estímulo de 6 horas con HRG. Las curvas de tiempo con HRG revelaron que los niveles de ARNm de TGFβ2 comienzan a aumentar a partir de los 30 minutos de estimulación llegando a un pico a las 2 horas. Estos resultados, sugieren que la activación de Rac1 por P-Rex1 desencadenada por la unión de la HRG a receptores ErbB, lleva a un aumento en los niveles de TGFβ2 que podrían contribuir al fenotipo de las células de cáncer de mama.

ABSTRACT

ErbB signaling triggered by ligands such as heregulins (HRG) promotes a strong activation of Rac1 in breast cancer cells. Rac1 is a Rho GTPase broadly implicated in cell motility, mitogenesis, transformation and metastasis. Rac1 is activated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs). It was recently discovered that P-Rex1 is a Rac-GEF essential for HRG induced breast cancer cell migration. P-Rex1 is highly overexpressed in human breast cancer and its derived luminal cell lines, such as T-47D. Data obtained from a cDNA microarray revealed that TGF β 2, a potent regulator of cell growth, differentiation and migration, increased its expression upon 6-hour of HRG stimulation. Moreover, this increase was dependent on P-Rex1. Failures of TGF β / SMAD signaling pathways have been implicated in a variety of human cancers. The mechanism by which TGF β acts as cells acquire the ability to invade and metastasize has not yet been elucidated. The general objective of this work was to develop the necessary experimental strategies to study the effect of TGF β 2 increase produced by activation of ErbB receptors on breast cancer progression. The specific aims of this work were: 1) set up a pull-down assay to measure Rac activation in T-47D cells; 2) to set up the experimental conditions to measure TGF β 2 mRNA levels by real time PCR (Q-PCR); and 3) To assess the timing of HRG-induced Rac activation and TGF β 2 upregulation. In this work we were able to express and purify a recombinant GST-PBD protein (P21 binding domain of PAK, a Rac1 effector) required for the Rac1 pull-down assay. In order to visualize differences in Rac activation among treatments we optimized the amount of GST-PBD to be used in each assay. When performing time curves with HRG on T-47D cells, we observed that Rac1 activation is induced, reaching a peak upon 5-minute stimulation, and that this activation decreases towards 6 hours. On the other hand, specific primers were designed for TGF β 2 and 18S genes, which were proved to be efficient for their use in Q-PCR reactions. We observed a 3-fold change in TGF β 2 mRNA levels after a 6-hours stimulation with HRG. However, time curves with HRG revealed that TGF β 2 mRNA levels begin to increase after 30 minutes of stimulation, reaching a peak at 2 hours. These results suggest that HRG stimulation of ErbB receptors induce P-Rex1-dependent Rac activation which leads to an increase in TGF β 2 levels that could contribute to the phenotype of breast cancer cells.

CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	6
1. LA MAMA	6
2. CÁNCER DE MAMA: CLASIFICACIÓN	7
3. RECEPTORES ERBB	8
4. RAC.....	9
5. P-REX1.....	11
6. TGFβ	12
7. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA EL CÁNCER DE MAMA.....	14
ANTECEDENTES	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
RELEVANCIA.....	17
METODOLOGÍA	18
1. EXPRESIÓN DE GST-PBD RECOMBINANTE.	18
2. ENSAYO DE <i>PULL-DOWN</i> DE RAC ACTIVADO.	19
3. SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.	20
4. TRANSFECCIÓN REVERSA DE CÉLULAS T-47D CON ARNi.	21
5. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	22
6. OBTENCIÓN DE ADN COPIA.	23
7. DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> PARA PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (Q-PCR).	23
8. DETERMINACIÓN POR Q-PCR DE LOS NIVELES DE ARNm DE TGFβ2.	23
9. ESTADÍSTICA.....	24
RESULTADOS.....	25
<i>OBJETIVO ESPECÍFICO 1: PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE PULL-DOWN DE RAC1 ACTIVADO EN CÉLULAS T-47D DE CÁNCER DE MAMA.</i>	25
<i>A. Expresión de la proteína de fusión GST-PBD en bacterias E. Coli.</i>	26
<i>B. Purificación de la proteína recombinante GST-PBD.</i>	27
<i>C. Cuantificación de la proteína de fusión GST-PBD.</i>	28
<i>D. Puesta a punto de la concentración óptima de GST-PBD a utilizar en los ensayos de pull-down de Rac1 activado.</i>	29
<i>E. Optimización del tiempo de estímulo con HRG necesario para ver una mayor activación de Rac1.</i>	31
<i>OBJETIVO ESPECÍFICO 2: DETERMINAR LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA MEDIR NIVELES DE ARN MENSAJERO DE TGFβ2 POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.</i>	32
<i>A. Diseño de primers específicos para TGFβ2 y 18S.</i>	32
<i>B. Cálculo de la eficiencia de los primers en la reacción de PCR en tiempo real.</i>	34
<i>C. Validación del método de ΔΔC_T.</i>	35
<i>OBJETIVO ESPECÍFICO 3: EVALUAR LA TEMPORALIDAD DE ACTIVACIÓN DE RAC Y DEL AUMENTO DE TGFβ2 INDUCIDOS POR HRG EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA T-47D.</i>	39
<i>A. Determinación de los niveles de Rac-GTP en el tiempo.</i>	40
<i>B. Determinación de los niveles de ARN mensajero de TGFβ2 en el tiempo.</i>	42
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
CONCLUSIONES.....	48

INTRODUCCIÓN

1. La mama

Los mamíferos se caracterizan por poseer glándulas mamarias encargadas de la producción y secreción de leche para la alimentación de sus crías. En humanos, la glándula mamaria se encuentra en la estructura anatómica denominada mama, cuya histología se conserva en todas las especies y consta de un parénquima glandular, compuesto de alvéolos y ductos rodeados por un estroma de soporte (Figura 1). En la mujer las mamas están poco desarrolladas hasta la pubertad, en la cual se da el proceso de maduración. La mama llega a su máximo desarrollo durante el embarazo y lactancia, luego de la cual comienza un proceso de involución.

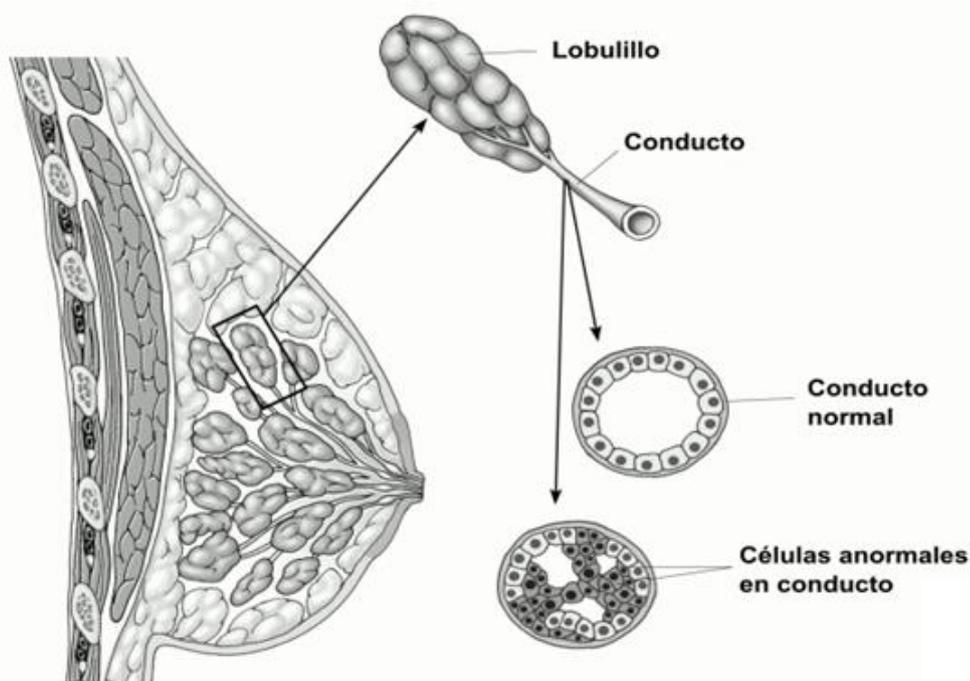


Figura 1: Esquema ilustrativo de la mama. En el esquema se observan las estructuras externas de la mama: el pezón y la areola, así como también las estructuras internas: conductos, lobulillos y tejido adiposo. También se esquematiza un corte transversal de un conducto lactífero normal y se lo compara con un conducto en el que existe un carcinoma ductal *in situ* (<http://www.clinicadima.com>).

La cara exterior de la mama está cubierta por piel. En el centro de dicha cara se encuentran el pezón y la areola (zona de la piel con mayor pigmentación que rodea al pezón).

La glándula mamaria está conformada por un conjunto de quince a veinte lóbulos mamarios, cada uno con su aparato excretor, que se irradian desde el pezón y que están

separados entre sí por tejido conjuntivo que conecta los lóbulos. Los espacios interlobulares están ocupados por tejido adiposo. Cada lóbulo es drenado por un conducto lactífero propio que lleva al pezón. Los lóbulos mamarios están constituidos por numerosos lobulillos formados por diez a cien acinos. Los acinos están conformados por un conjunto de células epiteliales lumbinales que producen la secreción láctea y forman una cavidad a la cual vierten esta secreción. Las células epiteliales están, a su vez, rodeadas por células mioepiteliales, que se disponen sobre la membrana basal y pueden contraerse de forma similar a las musculares para impeler la leche de los alvéolos a los ductos.

2. Cáncer de mama: Clasificación

La clasificación de los subtipos de cáncer de mama ha ido modificándose con el tiempo. A medida que se adquiere más conocimiento, surgen nuevas consideraciones para clasificar tumores.

La primera clasificación del cáncer de mama se basó en características histológicas para subdividir los tipos de tumores (<https://www.cancer.org>). Esta enfermedad puede comenzar en distintas áreas de la mama como los conductos, los lobulillos, y el tejido intermedio, definiendo la primera clasificación como sigue:

- Carcinoma ductal: Si el cáncer comienza dentro de los conductos lácteos. Se lo considera “no invasivo” debido a que no se propaga fuera del conducto lácteo hacia otros tejidos mamarios circundantes normales. Por otro lado, el carcinoma ductal invasivo (CDI) o infiltrante, tiene el mismo origen que el anterior, pero se caracteriza por haberse propagado hacia los tejidos mamarios que lo rodean.
- Carcinoma lobular: Este tipo de cáncer comienza en los lobulillos que son las glándulas productoras de leche de la mama. Generalmente se trata de un carcinoma lobulillar in situ (CLIS), pero también los hay invasivos.

El reconocimiento de la importancia del ER (receptor de estrógenos) (Slamon et al. 1987) y del HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano) así como el uso a gran escala de la inmunohistoquímica permitieron diferenciar a los pacientes de cáncer de mama en cuatro grupos principales:

- Luminal A: Presencia de ER, PgR (receptor de progesterona) y ausencia de HER2. Presenta bajo porcentaje de Ki67 (<14%) que es un marcador de proliferación.

- Luminal B: Presencia de ER. Puede o no presentar PgR y HER2. Alto porcentaje de Ki67 (>14%), es decir que tiene un alto índice de proliferación.
- Triple negativo: Ausencia de ER, PgR y HER2. Alto índice de Ki67. Asociado a un mal pronóstico para el paciente.
- HER2 positivo: Presencia muy marcada de HER2. Ausencia de ER y PgR. Alto índice de proliferación.

Recientemente, se ha descrito una nueva clasificación denominada “IntClust”. Esta es una clasificación de cáncer de mama que comprende 10 subtipos. La misma surge de un meta-análisis de mecanismos moleculares que llevan al cáncer y que fueron identificados mediante la integración de datos genómicos y transcriptómicos de 1000 tumores de mama (Ali et al. 2014).

3. Receptores ErbB

La familia de receptores tirosina quinasa (RTKs) está compuesta por ErbB1/HER (receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR), ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4 (Yarden & Sliwkowski 2001). Los receptores ErbB tienen una región extracelular de unión a ligando, una región intermembrana y una región citoplasmática que contiene el dominio tirosina-quinasa (dicho esquema excluye a ErbB2 ya que el mismo no presenta dominio extracelular de unión a ligando). Los mismos se expresan en varios tejidos de origen epitelial, mesenquimal y neuronal. En condiciones fisiológicas normales, la activación de estos receptores está controlada por la expresión temporal y espacial de sus ligandos, que son miembros de la familia de factores de crecimiento EGF. Hay tres grupos de ligandos. Un grupo se une específicamente al ErbB1 e incluye EGF, TGF α , anfiregulina (AR) y epigen (EPG). Un segundo grupo se une tanto a ErbB1 como a ErbB4 e incluye beta-celulina (BTC), HB-EGF y epirregulina (EPR). El tercer grupo incluye todas las heregulinas (HRG) 1-4, de las cuales HRG1 y HRG2 se unen a ErbB3 y ErbB4, mientras que HRG3 y HRG4 solamente se unen a ErbB4 (Hynes & MacDonald 2009).

Los receptores ErbB activados por ligando, se acoplan formando complejos homodiméricos o heterodiméricos con otros ErbBs (Graus-porta et al. 1997). La fosforilación cruzada de tirosinas en los dímeros de receptores, establece sitios de acoplamiento para proteínas adaptadoras y quinasas (Heldin 1995). Las vías de señalización activadas por ErbBs

están implicadas en proliferación, migración, diferenciación, supervivencia, y transcripción génica.

La familia de RTK es importante en la iniciación y progresión del cáncer de mama (Dankort & Muller 2000). La hiperactivación de receptores, la sobreexpresión de ligandos de ErbB como heregulinas, o el aumento de ciertas moléculas río abajo en la cascada de señalización de ErbBs (como la hiperactividad de la vía de PI3K), juegan roles fundamentales en la etiología del cáncer de mama (Wang & Hung 2001; Humphreys & Hennighausen 2000; Pilichowska et al. 1997; Stove & Bracke 2004).

ErbB2 es el único miembro de la familia de receptores ErbB que no contiene dominio extracelular de unión a ligando, sin embargo, dimeriza con otros ErbB para gatillar la señalización. La sobreexpresión de ErbB2 ocurre en un 20-30% de los casos de cáncer de mama, en los que se lo relaciona con un mal pronóstico para el paciente (Slamon et al. 1987).

4. Rac

Rac1, una Rho GTPasa ampliamente implicada en motilidad, mitogénesis, transformación y metástasis. Al igual que la mayoría de las pequeñas GTPasas, Rac actúa como un interruptor molecular que alterna entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. El GTP es hidrolizado a GDP a través de la actividad GTPasa intrínseca de Rac (Wennerberg & Der 2004). El intercambio entre GDP y GTP está regulado principalmente por dos proteínas: GEFs (Factores intercambiadores de nucleótidos guanina) que facilitan la carga de GTP y activan Rac; y GAPs (Proteínas activadoras de GTPasas) que estimulan la hidrólisis de GTP potenciando la actividad GTPasa intrínseca, lo que conduce a la inactivación de la pequeña GTPasa. Una tercera clase de proteínas conocidas como Rho GDI (Inhibidoras de disociación de GDP) secuestran las GTPasas inactivas en el citosol, impidiendo su translocación a la membrana y su posterior activación (Del Pozo et al. 2002; Etienne-Manneville & Hall 2002).

Rac regula la reorganización del citoesqueleto, ya que promueve el ensamblado de actina para la formación de lamelipodios (Ridley et al. 1992). La regulación de la dinámica del citoesqueleto es esencial para el mantenimiento de la morfología celular, la polaridad, la adhesión y la migración (Bustelo et al. 2007). Además de sus efectos sobre la reorganización del citoesqueleto de actina, Rac controla una serie de funciones adicionales, incluyendo la

regulación del ciclo celular, la endocitosis y la fagocitosis (Thiel et al. 2002; Wells et al. 2004).

La señalización a través de Rac también controla la expresión génica de factores claves para la progresión del cáncer de mama, como son la ciclina D y el factor de transcripción SRF (Zohn et al. 1998; Joyce et al. 1999; Hill et al. 1995).

Miembros de la familia de pequeñas GTPasas Rho median respuestas gatilladas por receptores ErbB. La unión de EGF y ligandos de ErbB3 como la HRGβ1 activa fuertemente a Rac en células de cáncer de mama MCF7 y T-47D (Yang et al. 2006). Es más, la inhibición de Rac impide la motilidad y la proliferación de las células de cáncer en respuesta a ligandos de EGFR y ErbB3 (Yang et al. 2006; Liu et al. 2008; Wang et al. 2006). La activación de Rac por HRG es mediada por ErbB3, ErbB2 y por la transactivación del EGFR. Sin embargo, es independiente de ErbB4 (Yang et al. 2006).

Existe contundente evidencia de que Rac es hiperactivada en cáncer, inclusive en cáncer de mama. La causa más común de la hiperactivación de Rac es la desregulación de los mecanismos río arriba incluyendo la señalización excesiva de receptores o de moléculas intermedias como PI3K. En última instancia, tales señales tendrán un impacto en el estado de activación de Rac-GEFs. De hecho, varios Rac-GEFs como Tiam1, Ect2 y P-Rex1, desempeñan un papel importante en la tumorigénesis y metástasis y están hiperactivados en cáncer (Miki et al. 1993; Habets et al. 1994; Qin et al. 2009; Sosa et al. 2010; Montero et al. 2011). Tumores de mama presentan altos niveles de fosfo (activada)-Pak1, un conocido efector de Rac (Balasenthil et al. 2004; Salh et al. 2002). Es más, está surgiendo evidencia que relaciona a Rac con dependencia a estrógeno y resistencia a anti-estrógenos. Por ejemplo, la sobreexpresión de la proteína activadora de Rac AND-34/BCAR3 promueve resistencia a anti-estrógenos vía la inducción de ciclina D1 (Cai et al. 2003) y la hiperactivación de Pak1 correlaciona con la resistencia a tamoxifeno, que es un antagonista de los ER (receptores de estrógeno) empleado como terapia alternativa en pacientes de cáncer de mama (Holm et al. 2006). Rac1 también controla la activación de Erk1/2 y la inducción de ciclina D1 por HRG (Yang et al. 2008). Estudios del grupo de Dr. Arteaga establecieron que la vía de Rac está implicada en la tumorigénesis dirigida por ErbB2 (S E Wang et al. 2006). Sin embargo, las moléculas intermedias que llevan a la activación de Rac por receptores ErbB no han sido aun completamente dilucidadas.

5. P-Rex1

La hiperactivación de la señalización de receptores ErbB es un sello distintivo frecuente en cáncer de mama. La sobreexpresión de ErbB2 y/o de ligandos de ErbB como HRG es una característica común del cáncer de mama y conduce al crecimiento descontrolado y a la transformación (Hynes & Lane 2005; Citri et al. 2003; Yarden & Sliwkowski 2001). El rol de Rac1 como mediador de la señalización de ErbB llevó a varios laboratorios a buscar Rac-GEFs relevantes en esta vía (Sosa et al. 2010). Dicho estudio reveló que el intercambiador de Rac dependiente de fosfatidil inositol-3,45-trifosfato (P-Rex1), está altamente expresado en un número importante de líneas celulares de cáncer de mama humanas de origen luminal como MCF-7 y T-47D y en aproximadamente el 60% de tumores de mama, particularmente aquellos de origen luminal. En contraste, P-Rex1 es apenas detectable en tejido mamario normal o en las células no tumorigénicas MCF-10, así como en células tumorales de origen basal. .

Una característica distintiva de P-Rex, es que es activado sinérgicamente por el producto de PI3K, PIP3, y las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas-G heterotriméricas (Welch et al. 2002; Donald et al. 2004; Rosenfeldt et al. 2004; Mayeenuddin et al. 2006; Barber et al. 2007).

La activación de P-Rex1 por receptores ErbB depende de la vía CXCR4/G $\beta\gamma$ /PI3K (Sosa et al. 2010). Es más, resultados con toxina colérica establecieron que existe una transactivación dependiente de receptores acoplados a una proteína Gi que es requerida para las respuestas mediadas por receptores ErbB (Figura 2). Un análisis funcional reveló que el silenciamiento de P-Rex1 impide la activación de Rac por los ligandos del EGFR, EGF y TGF α , o por ligandos de ErbB3 como la HRG. El silenciamiento de otros Rac-GEFs como Vav2, Vav3 y Tiam1 no afectó la activación de Rac por HRG. Es más, el vaciamiento de P-Rex1 impidió la migración inducida por HRG en células T-47D y MCF7. El silenciamiento de P-Rex1 afectó muy marcadamente la migración inducida por ErbB2 y la tumorigenicidad en ratones nude. Estos resultados, situaron a P-Rex1 como un factor clave en la progresión del cáncer de mama.

6. TGFβ

La familia de citoquinas TGFβ (factor de crecimiento transformante beta), consta de tres isoformas (TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3) y regula proliferación, diferenciación, adhesión, migración y otras funciones en muchos tipos celulares (Siegel & Massagué 2003; Derynck & Zhang 2003). En cáncer, la señalización por TGFβ regula la iniciación tumoral, la progresión y la metástasis tanto a través de la señalización autocrina, por parte de las células tumorales, como de la secreción de TGFβ por células del estroma tumoral. TGFβ señala a través de un

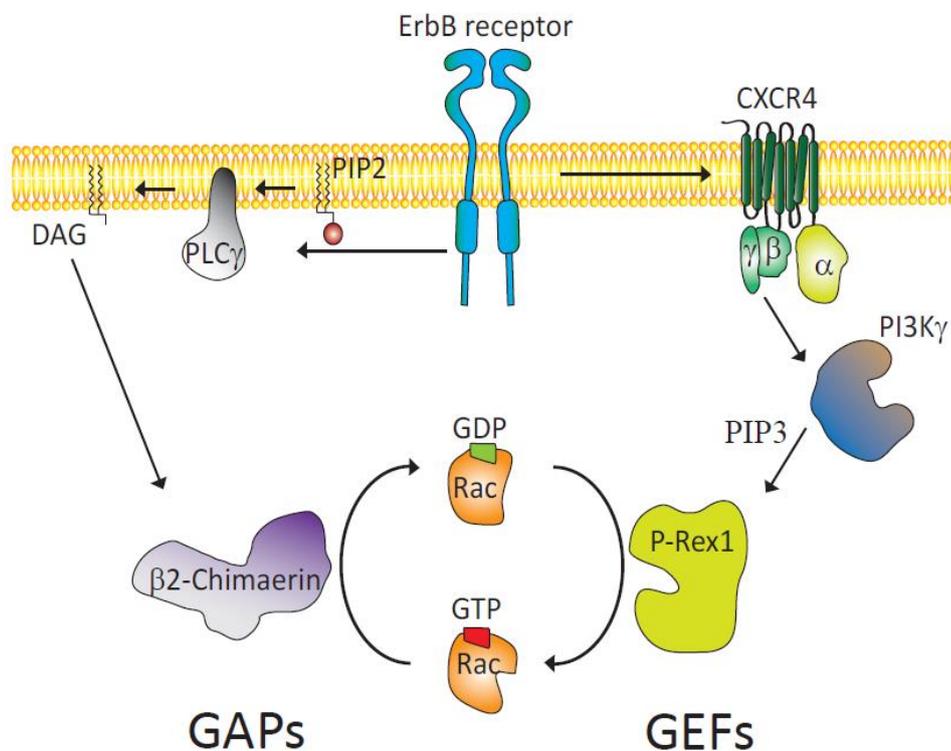


Figura 2: Modelo de la regulación de la actividad de Rac por GEFs y GAPs en cáncer de mama. Los receptores ErbB activan a P-Rex1 (un GEF de Rac dependiente de PI3K y Gβγ) a través de la transactivación de CXCR4 (receptor acoplado a proteína G). El GAP de Rac beta-quimerina es regulado también por receptores ErbB y actúa como un freno para la activación de Rac (Wertheimer et al. 2012).

complejo heteromérico de receptores transmembrana del tipo serina/treonina quinasa tipo I y tipo II (Massagué 1998). Cada miembro de la superfamilia TGFβ se une a una combinación característica de receptores de tipo I y de tipo II. La unión del ligando induce el ensamblaje de receptores de tipo I y de tipo II en complejos, dentro de los cuales el tipo II fosforila al tipo I (Shi & Massagué 2003). El complejo de señalización heteromérico TGFβRI-TGFβRII se

asocia comúnmente con cáncer y regula la activación río abajo de vías de señalización dependientes e independientes de los Smads (Siegel & Massagué 2003; Derynck & Zhang 2003). En respuesta a la activación de este complejo, los Smad asociados a receptor (Smad2 y Smad3) forman complejos homo y heterotriméricos que involucran al mediador Smad4. Estos complejos luego translocan al núcleo, donde regulan la transcripción (Feng & Derynck 2005). Además de la bien caracterizada vía de señalización de Smad, que se sabe que desempeña un papel en la regulación del cáncer, hay vías reguladas por TGF β que son independientes de Smad como las de RHOA, CDC42, Rac1, RAS y PI3K (Petritsch et al. 2000; Siegel & Massagué 2003).

Paradójicamente, TGF β induce apoptosis o arresto celular en células normales o “menos transformadas” pero aumenta la motilidad celular y metástasis en células malignas (Roberts & Wakefield 2003). El mecanismo por el cual las vías de señalización de TGF o sus genes blanco cambian a medida que las células adquieren la capacidad de invadir y hacer metástasis aún no ha sido dilucidado. Incluso, no se sabe si TGF β utiliza las mismas cascadas de señalización o diferentes para mediar sus efectos como supresor tumoral u oncogén. Se ha observado que la activación de la señalización de TGF β retrasa la aparición de tumores primarios, mientras que en ratones en los que la vía de señalización ha sido silenciada de forma estable, los tumores aparecen antes. Esto se condice con un rol de supresor tumoral de esta vía en las etapas tempranas de la tumorigénesis. En contraste, ratones que expresan un receptor de TGF β activado exhiben una mayor formación de metástasis espontáneas en pulmón, consistente con un efecto pro-oncogénico de TGF β en estadios tardíos de la enfermedad (Siegel & Massagué 2003). Muchos investigadores están ahora enfocados en comprender y controlar la metástasis, ya que las mismas son las principales responsables de la muerte de los pacientes. La idea de que TGF β ejerza un efecto pro-oncogénico opuesto a lo que se conocía, y que, posiblemente, incluso se requiera para la metástasis evidencian la necesidad de generar información sobre las vías específicas y genes implicados en este cambio de supresor tumoral a oncogén. Esta información es fundamental para el diseño de nuevas alternativas para prevenir la metástasis en pacientes.

7. Tratamientos actuales para el cáncer de mama

Los tratamientos que se apliquen van a depender de la etapa de la enfermedad en la que se encuentre el paciente y del tipo de tumor que presente (<https://www.cancer.org>), pero en líneas generales son los siguientes:

- **Remoción por cirugía:** Si el tumor es pequeño y está bien localizado, se procede a extirpar el mismo y un poco de tejido normal circundante mediante una cirugía con conservación del seno. En caso de el tumor sea grande, o de que haya más de uno se realiza una mastectomía que es una remoción total del seno.
- **Radioterapia:** Es una terapia que utiliza rayos de alta energía (como los rayos X) para eliminar las células malignas. Se aplica después de una cirugía con conservación de seno, mastectomía, o bien si el cáncer se ha propagado hacia otras partes del cuerpo como los huesos o el cerebro.
- **Terapia hormonal:** Es una forma de terapia sistémica que se usa para tratar a tumores con receptores hormonales positivos. Se puede usar como terapia neoadyuvante, antes de la cirugía, o después de la misma para reducir el riesgo de que el cáncer regrese. El medicamento más usado es el tamoxifeno, que es un antagonista del receptor de estrógeno (ER), el mismo induce un cambio conformacional en el receptor, que bloquea la expresión de los genes que dependen del mismo. También se emplean inhibidores de aromatasas, que es una enzima implicada en la síntesis del estrógeno. Otra alternativa es la ablación ovárica, que consiste en extirpar o suspender la función de los ovarios, que son la principal fuente de estrógenos.
- **Quimioterapia:** Es una terapia sistémica que puede ser administrada por vía intravenosa u oral. Se aplican múltiples combinaciones de medicamentos que afectan la división celular. Dado que las células malignas tienen una mayor tasa de división son las principales afectadas. Se puede aplicar antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor, o después de la misma para tratar de eliminar las células cancerosas que pudieron haber quedado.

Terapia dirigida para tumores HER2 positivos: Es una terapia dirigida, ya que a diferencia de la quimioterapia no afecta a todas las células, sino a aquellas que presentan a este receptor en su superficie. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 que

puede ser usado en combinación con quimioterapia o solo. Recientes ensayos clínicos y preclínicos sugieren que la inmunoterapia tiene el potencial de mejorar los resultados para los pacientes con cáncer de mama. Como fue mencionado, existen tres tratamientos de inmunoterapia aprobados para el cáncer de mama: los anticuerpos dirigidos al receptor ErbB2, pertuzumab y trastuzumab, y conjugados de anticuerpo-fármacos. Otras inmunoterapias han mostrado resultados prometedores para el cáncer de mama en ensayos clínicos recientes, como las vacunas, los inhibidores de puntos de control (checkpoint inhibitors)/moduladores inmunitarios y la terapia celular adoptiva (transferencia de células T). Otros ensayos clínicos incluyen terapias con virus oncolíticos, anticuerpos, inmunoterapias adyuvantes y citoquinas.

ANTECEDENTES

Como fue mencionado en la introducción, P-Rex1, un Rac-GEF dependiente de PIP3 y proteína G $\beta\gamma$, es esencial para la activación de Rac1 y la migración inducida por ligandos de receptores ErbB y por sobreexpresión de ErbB2 (Sosa et al. 2010). Es más, el silenciamiento de la expresión de P-Rex1 inhibe profundamente la tumorigénesis dependiente de ErbB2. P-Rex1 está altamente sobreexpresado en cáncer de mama humano y en sus líneas celulares de tipo luminal derivadas, incluyendo a MCF-7, BT-474 y T-47D. La relevancia de P-Rex1 fue reportada en paralelo por otros grupos de investigación, no solo en cáncer de mama, sino también en cáncer de próstata (Qin et al. 2009). Es por ello que surgió el interés de determinar el rol de P-Rex1 en el patrón génico desencadenado por la estimulación de receptores ErbB con HRG. En este sentido, la Dra. Wertheimer determinó en estudios de *microarray* el perfil de expresión de genes que se estimulan río abajo de receptores ErbB en las células de cáncer de mama T-47D (Barrio-Real et al. 2016). Este primer análisis reveló que la activación de los receptores ErbB modifica la expresión de un alto número de genes implicados en la progresión del cáncer de mama, en particular en los procesos migratorios e invasivos. En particular, este análisis reveló que la expresión de TGF β 2 (citoquina que regula proliferación, diferenciación, adhesión, migración y otras funciones en muchos tipos celulares) aumenta luego del tratamiento con HRG y que ese aumento es dependiente de P-Rex1. Se sabe que la activación de Rac1 es necesaria para algunas respuestas celulares y transcripcionales dirigidas por TGF β 1. Es más, TGF β 1 puede activar RhoA y Rac1, aportando a la transición epitelio-mesenquimal y a una motilidad aumentada (Xu et al. 2009).

Son escasos los reportes que postulan la interacción entre las vías de señalización de TGF β y los receptores ErbB, y los mecanismos moleculares que subyacen en dicha interacción no han sido aún dilucidados. La sobreexpresión de ErbB2 en células mamarias induce mayor motilidad y actividad de Rac1 en respuesta a TGF β 1 sugiriendo que las vías de señalización de ErbB2 y TGF β pueden cooperar en la inducción de eventos celulares requeridos para la progresión tumoral (Shizhen Emily Wang et al. 2006). TGF β 1 ha sido colocalizada con Rac1 activado y con su efector Pak1 en el lamelipodio de células mamarias sobreexpresando ErbB2, llevando a una activación prolongada de Rac1 y a una mayor motilidad y sobrevida de dichas células comparado con células mamarias carentes de ErbB2. Todo esto sugiere que las vías de ErbB y TGF β 2 podrían converger en Rac1 y sinergizarse para la progresión tumoral.

HIPÓTESIS

Proponemos que la estimulación de los receptores ErbB3 con HRG induce la producción de TGF β 2 a través de la activación de Rac1 dependiente de P-Rex1. Bajo estas condiciones, al ser secretado, TGF β 2 podría actuar como un factor autocrino. Así, se uniría a sus receptores de membrana produciendo, a través de la señalización desencadenada por los mismos, una retroalimentación positiva sobre la activación de Rac1 en células T-47D de cáncer de mama. Dicha acción sería necesaria para desencadenar los eventos relacionados con la migración celular y/o potenciar las capacidades invasivas de las células de cáncer.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar las estrategias experimentales necesarias para estudiar el efecto sobre la progresión del cáncer de mama del aumento en la expresión de TGF β 2 producido por la activación de los receptores ErbB.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1: Poner a punto la técnica de *pull-down* de Rac activado en células T-47D de cáncer de mama.

Objetivo específico 2: Determinar las condiciones experimentales para medir niveles de ARN mensajero de TGF β 2 por PCR cuantitativa en tiempo real.

Objetivo específico 3: Evaluar la temporalidad de activación de Rac y del aumento de TGF β 2 inducidos por HRG en células de cáncer de mama T-47D.

RELEVANCIA

Según la organización mundial de la salud (OMS) el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Siendo el cáncer de mama el más frecuente en mujeres tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo. En Argentina el cáncer de mama es la segunda causa de muerte después del cáncer de pulmón, con una incidencia del 32.2% en mujeres. Anualmente, se registran alrededor de 20000 casos y la mortalidad es del 19.7%. Además de las cifras de mortalidad, el cuidado de los pacientes con cáncer de mama es un problema crítico de salud pública y representa una carga económica en Argentina. Alta incidencia significa una gran proporción de mujeres que se someten a cirugía, radioterapia y quimioterapia, lo cual afecta su capacidad de trabajo y el cuidado de sus familias, sugiriendo grandes pérdidas a nivel económico (Justo et al. 2013).

Los tumores de mama luminales son muy frecuentes en las poblaciones occidentales y, por lo tanto, es imprescindible identificar biomarcadores de la población local con el potencial de mejorar el diagnóstico precoz, conocer con anticipación posibles resistencias a los medicamentos y proporcionar pautas de tratamiento que incluyan terapias dirigidas.

El descubrimiento de P-Rex1 como un factor clave en la progresión del cáncer de mama tiene enormes implicancias tanto desde el punto de vista pronóstico como terapéutico. Es posible que la sobreexpresión de P-Rex1 represente un biomarcador para el cáncer de mama de tipo luminal que brinde información acerca de la agresividad de la enfermedad y la posibilidad de metástasis.

Datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que el aumento de TGF β 2 en células de cáncer de mama T-47D es parcialmente dependiente de P-Rex1. Fallas de las vías de señalización de TGF β /SMAD han sido implicadas en una variedad de cánceres humanos y en particular en cáncer de mama. Sin embargo poco se conoce sobre el mecanismo de activación ni las vías de señalización que se activan para que esta citoquina ejerza su rol como pro-oncogén. Nosotros proponemos, como hipótesis de trabajo, que existe una interacción entre las diferentes vías de señalización que comparten un nodo de convergencia en P-Rex1 / Rac, e interactúan complementaria o sinérgicamente durante la progresión del cáncer de

mama. Aquí, nos focalizaremos en desarrollar una serie de herramientas adecuadas a fin de verificar dicha hipótesis. De ser comprobado, nuestro modelo podría ser importante para el tratamiento de pacientes con tumores de mama positivos para ErbB2. Por ejemplo, es posible que terapias combinadas dirigidas a ErbB2 y TGF β 2 puedan constituir un tratamiento efectivo para pacientes no respondedores a Trastuzumab.

Finalmente, descifrar los mecanismos que derivan en una regulación positiva de P-Rex1 en cáncer de mama, brindarían un mayor entendimiento de los mecanismos implicados en la transformación de células mamarias y la resistencia a agentes terapéuticos.

METODOLOGÍA

1. Expresión de GST-PBD recombinante.

Se cultivaron bacterias *E. coli BL21* transformadas con el plásmido pGEXTK-PAK1 en placas con agarosa y medio LB (Luria Bertani) suplementado con 50 μ g/mL de ampicilina (LB/Ampi). Posteriormente se repicó una colonia para preparar un inóculo en 1 ml de medio LB/Ampi que se incubó en agitación a 200 rpm y 37° C. Transcurridas 6 horas, el inóculo se introdujo en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 250 mL de LB/Ampi y se dejó incubando en las condiciones anteriores durante toda la noche. Al día siguiente, se dividió el cultivo a la mitad y se llevó a cada una de ellas a un volumen final de 500 mL de LB/Ampi. Cada Erlenmeyer conteniendo las bacterias se incubó en las condiciones detalladas hasta que la densidad óptica a A₆₀₀ del cultivo se encontró entre 0,8 y 1. En ese momento se procedió a estimular a las bacterias con una solución de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), concentración final 1 mM, durante 4 horas, siempre en las condiciones de crecimiento anteriores. Transcurrido ese tiempo, se dividió el cultivo en botellas de 250 mL que se centrifugaron en una centrífuga Sorvall RC-5B a 6000 x g, a 4°C durante 10 minutos, obteniéndose un *pellet* de bacterias. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en 20 mL de PBS (solución reguladora salina de fosfato) con inhibidores de proteasas (Sigma) en una concentración de 1/500. Luego se sometió a la suspensión de bacterias a 6 ciclos de 15 segundos de sonicado con 2 minutos de reposo en hielo. A continuación se agregó Tritón X-100 a una concentración final de 1% y se colocó la suspensión en un agitador orbital durante 1 hora.

El extracto de bacterias obtenido fue centrifugado en una centrífuga Sorvall RT-6000 durante 1 hora a 2000 x g y 4°C. El sobrenadante de este extracto se incubó con bolitas de glutatión sefarosa (50% V/V), en rotación y durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó el extracto a 40 x g por 5 minutos y se obtuvo un pellet de bolitas de Sefarosa unidas a la proteína recombinante. Luego de lavar dicho pellet 3 veces con 10 mL de PBS frío, el mismo se resuspendió en 3,5 mL de una solución de elución (Tris 50 mM, glutatión reducido 10 mM) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. El eluido se introdujo en una columna de desalado PD-10 (GE Healthcare) y se descartó la fracción inicial. Luego, se agregaron a la columna 3,5 mL de PBS con inhibidores de proteasa (1/500) y el eluido conteniendo la proteína recombinante fue recuperado.

Para determinar la concentración de proteína se midió absorbancia a A_{280} . De forma complementaria, se midió la concentración proteica usando el reactivo de Bradford. Subsiguientemente, la proteína recombinante fue diluida al medio con glicerol para su conservación y separada en alícuotas de 250 $\mu\text{g/mL}$ y almacenada a -80°C hasta su utilización para ensayos de Rac.

2. Ensayo de *pull-down* de Rac activado.

Para los ensayos se utilizaron células T-47D, una línea celular de cáncer de mama de tipo luminal. Las mismas fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) y mantenidas en el laboratorio por 20 repiques y controlada asiduamente la presencia de micoplasma por tinción con Hoesch. Las células T-47D fueron crecidas en monocapa en una placa de Petri P100, en medio DMEM alta glucosa (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios) y 1% de penicilina-estreptomina (GIBCO). Se retiró el medio de una placa confluyente y luego de dos lavados con 10 mL de PBS se incubaron las células con 700 μL de tripsina/EDTA 0.25% (GIBCO) por 3 minutos a 37°C. Finalizado este tiempo, se agregaron 10 mL de medio con suero y se terminó de disgregar la monocapa de células por pipeteo. Luego de determinar la concentración de la suspensión de células por conteo en un hemocitómetro, se procedió a colocar 300.000 células por placa en 3 mL de volumen final de medio (concentración final 100.000 células/mL en placas de Petri P60). Para el hambreado de las células, 24 horas después de la siembra, se procedió a cambiar el medio suplementado por medio DMEM sin factores de crecimiento. Pasadas 48 horas se agregó el

estímulo pertinente por el tiempo determinado en cada experimento. Luego de realizar el tratamiento, se quitó el medio de cultivo de cada placa, se realizó un lavado con PBS frío y se agregaron 500 μL de una solución de lisis (Tris 20 mM pH=7,5, NaCl 150 mM, MgCl 5 mM, NP40 0,5%, β -glicerofosfato 5 mM, DTT 1 mM suplementada con inhibidores de proteasa 1/500) suplementada con 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína recombinante GST-PBD. Se usó un rascador para despegar las células de la placa y se colectó el extracto celular en tubos de tipo Eppendorf de 1,5 mL. Dicho extracto fue centrifugado a 10000 x g por 12 minutos y el *pellet* fue descartado. Para obtener extractos control de proteínas totales, se tomó una alícuota de 80 μL de cada tratamiento a la que se le agregaron 20 μL de solución de siembra 5X suplementada con βME (2-Mercaptoetanol) 5% V/V. A otra alícuota de 350 μL de cada tratamiento se le adicionaron 100 μL de bolitas de glutatión sefarosa (5% V/V) y se incubaron en un homogeneizador orbital durante 45 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos a 2000 x g por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se hicieron 2 lavados con 1 mL del *buffer* de lisis utilizado anteriormente en el ensayo (sin PBD). Por último, se resuspendieron las bolitas en 8 μL de solución de siembra 5X con βME . Las muestras obtenidas de proteínas totales y de *pull-down* fueron hervidas por 5 minutos y luego sometidas a SDS-PAGE.

3. SDS-PAGE y Western Blot.

Los extractos proteicos se corrieron en geles de poliacrilamida (el porcentaje de poliacrilamida dependiente del peso molecular de las proteínas a detectar). Cada gel contenía un pocillo con 7 μL de una combinación de proteínas estándar de pesos moleculares (Precision Plus ProteinAllBlueStandards, Bio-Rad). La electroforesis fue realizada en solución reguladora de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1% P/V, pH 8.3) en una celda Mini Protean 3 (Bio-Rad). A continuación, los geles fueron transferidos a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad) a 100 V por 1 hora usando una celda Mini Trans-Blot (Bio-Rad).

Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente, en solución de bloqueo (leche descremada o seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) 5% P/V en una solución reguladora de TBS y Tween-20 0,1% P/V (TTBS)).

Finalizado el bloqueo, se llevaron a cabo 3 lavados por incubación en agitación con TTBS por 10 minutos.

Para la detección de las proteínas Rac1 y β -tubulina, las membranas fueron incubadas durante 2 horas a 4°C con una dilución 1/1000 (concentración final 1 μ g/ml) de un anticuerpo monoclonal anti-Rac1 (EMD Millipore) y una dilución 1/1000 de un anticuerpo Anti- β -tubulina (Abcam, concentración final 1 μ g/ml). Las diluciones de ambos anticuerpos fueron realizadas en solución de bloqueo con leche. Para la detección de la versión fosforilada de ERK (pERK), las membranas fueron incubadas 12 horas con un anticuerpo policlonal (CellSignaling), el cual fue diluido 1/1000 en solución de bloqueo con BSA.

Finalizada la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con TTBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a HRP (peroxidasa de rabanita). Los anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulina de ratón o de conejo según corresponda, se utilizaron a una dilución 1/5000 en TTBS. Finalizada esta segunda incubación, se realizaron 3 lavados por 5 minutos a temperatura ambiente con TTBS y las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia en placas radiográficas (AGFA) utilizando una solución ECL (Tris 0,1 M pH 8,5, Luminol 1,25 mM, ácido p-cumárico 0,2mM y H₂O₂ 0,06% V/V).

4. Transfección reversa de células T-47D con ARNi.

En placas de Petri P60 se colocaron 1 mL de medio Opti-MEM (Thermo Fisher), distribuyéndolo por toda la superficie de la placa, y 5 μ L de una solución 20 μ M de los ARNi (ARN de interferencia) a utilizar. Para el silenciamiento de P-Rex1 se utilizaron dos variantes de ARNi específicas (Dharmacon, cat# J-010063-11 y J-010063-12) y un control de ARNi no específico (Dharmacon, cat# D-001810-01-05). El ARNi se co-incubó con el Opti-MEM por 5 minutos y luego se agregaron 15 μ L de lipofectaminaRNAiMAX (ThermoFisher). Después de 20 minutos de incubación, se agregaron 3 mL de una suspensión con 300.000 células en medio DMEM suplementado con suero sin antibiótico (concentración final 75.000 células/ml).

Luego de 24 horas se quitó el medio presente en las placas y se reemplazó por 3 mL de medio DMEM suplementado con suero sin antibiótico. Después de una incubación de 24

horas se siguió el mismo procedimiento de hambreado explicado anteriormente y se realizaron los experimentos con los estímulos correspondientes.

5. Extracción de ARN total

Se partió de placas de petri P60 con 300.000 células T-47D cada una, las cuales habían sido privadas de factores de crecimiento 48 horas antes del experimento. Luego de realizar los tratamientos correspondientes, se quitó el medio DMEM y se adicionaron a las placas 700 μ L de TRIzol(LifeTechnologies). Se usó un rascador de plástico para separar a las células de la placa. Todo el procedimiento se realizó en frío y sin demorar más de 2 minutos con cada muestra a fin de evitar la degradación del ARN. El lisado celular fue colocado en tubos tipo Eppendorf libres de DNAsas y RNAsas, y se le agregó 140 μ L de cloroformo (triclorometano) a cada uno. Luego de una agitación manual de los tubos durante 2 minutos, las muestras fueron centrifugadas a 4°C, durante 15 min a 12000 x g con el fin de obtener una separación de fases: acuosa y orgánica. Un volumen de la fase acuosa de 350 μ L conteniendo el ARN fue transferida a otro tubo de centrifuga, y la fase orgánica descartada. El ARN fue precipitado por agregado de isopropanol en proporciones 1:1, e inmediatamente centrifugado a 12000 x g por 10 min a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante delicadamente teniendo cuidado de no desprender el pellet, el cual fue lavado con etanol 75 %, centrifugado a 7500 x g por 5 min y luego secado a temperatura ambiente. Posteriormente el pellet fue resuspendido delicadamente en 20 μ L de agua libre de nucleasas (Genbiotech) e incubado a 57 °C por 10 minutos para facilitar su disolución. La concentración y pureza de las muestras de ARN fueron evaluadas por absorbancia a 260 nm en un Nanodrop (EppendorfBioPhotometer® D30) por el método de RNA-6000-NanoDrop. La ausencia de contaminación fue verificada por cuantificación de la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (260/280) sabiendo que relaciones inferiores a 1,7 indican contaminación con proteínas, fenol u otros contaminantes. En todas las muestras analizadas los valores de pureza del ARN se encontraron entre 1.8 a 2.0. La integridad del ARNm fue verificada en las muestras mediante corridas en gel de agarosa (2 %) con agregado de 4 μ L de bromuro de etidio, corridos en buffer TAE (Tris 39,8 mM, EDTA 1 mM) a 100 V constante. Para ello se tomaron 0.5 μ g de cada muestra, se las llevaron a un volumen final de 5 μ L con agua ultrapura y se les agregó 1 μ L de solución reguladora de carga para su posterior visualización. Se sembraron 6 μ L de muestra en cada

calle del gel y 2,5µL de marcador de peso molecular en una calle a elección, dicha corrida fue visualizada en un transiluminador con luz UV. Las muestras fueron conservadas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

6. Obtención de ADN copia.

A partir de 1 µg de ARN total, se usó la enzima ADNasa libre de ARNasa (Invitrogen) en 10 µl (volumen final) de mezcla reactiva para excluir el ADN genómico contaminante que pudiera haber. Después de la digestión, se procedió a la síntesis del ADN copia (ADNc) por agregado de 10 µl de una mezcla de: 125 ng de *random primers*, 0.5 mM de la mezcla de dNTPs (desoxinucleótido trifosfato) y la enzima transcriptasa reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción fue homogeneizada y colocada en el termociclador programado con un ciclo con tres estadios térmicos y finalmente enfriada: 1) 10 min a 25°C; 2) 50 min a 37°C; 3) 15 min a 70°C; 4) 5 min a 4°C.

7. Diseño de *primers* para PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR).

Para la cuantificación de los niveles de ARNm de los genes de interés, se llevó a cabo un diseño de *primers* específicos utilizando herramientas de bioinformática que son gratuitas en la red. Se siguieron los lineamientos planteados por el Dr. Basu (Thornton & Basu 2011). A partir de los 10 pares de *primers* candidatos que devuelve el programa, se analizaron las estructuras secundarias que se pudieran formar entre *primers* iguales o entre los *primers* del par en la reacción de PCR usando el programa Beacon Designer. Se eligieron *primers* que no formaran estructuras secundarias. Por último, se corroboró que no haya estructuras secundarias en el producto de la reacción de PCR, utilizando el programa UnaFold.

Una vez obtenidos los *primers* para cada gen de interés, los oligos se mandaron a sintetizar a la empresa Invitrogen.

8. Determinación por Q-PCR de los niveles de ARNm de TGFβ2.

La reacción de Q-PCR se realizó en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett). La mezcla de reacción se preparó usando 5 u/µL de polimerasa GoTaq (Promega), 10mM de mezcla de dNTPs (Genbiotech), 2,5 nM de *primers* sentido y antisentido (Invitrogen), colorante

fluorescente EvaGreen (Biotium) 1X, y solución reguladora para la polimerasa GoTaq (Promega) 1X, en un volumen final de 12,5 μ L. El programa de amplificación constaba de: desnaturalización inicial de 5 minutos, y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 segundos, luego 30 segundos de hibridación a 60°C, y extensión a 72°C por 20 segundos.

Para el gen de interés y el gen control se llevaron a cabo curvas estándar y de disociación para confirmar una adecuada eficiencia y especificidad de amplificación del producto, utilizando una muestra control.

Los datos fueron normalizados con el gen del ARN ribosomal 18S. En todos los casos, las mediciones se realizaron por triplicado. Para analizar los datos se utilizó el método de $\Delta\Delta C_T$, previa validación del mismo. Los datos fueron expresados como “veces de cambio” respecto del gen control. Los datos fueron procesados con el software Rotor-Gene Q series, proveído por el fabricante del ciclador.

9. Estadística

Para cada experimento se obtuvieron al menos tres replicas biológicas independientes. Para el análisis estadístico de la cuantificación de *western blot* se utilizó como variable dependiente la razón: unidades arbitrarias de intensidad de banda de Rac activado/Rac total. Para el análisis de datos de Q-PCR se utilizó como variable dependiente el ΔC_T para cada punto. En ambos casos la variable independiente fue el tiempo y el modelo estadístico utilizado fue ANOVA de un factor. En todos los casos se utilizó estadística paramétrica y para que las conclusiones del análisis de la varianza (ANOVA) sean válidas, al realizar el diseño experimental se tuvo en cuenta que se cumplan los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Estos supuestos se estudiaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Las comparaciones se efectuaron utilizando las pruebas *post-hoc* de Bonferroni, Tukey o Newman Keuls según correspondiera. Se consideraron significativas aquellas pruebas con $p < 0,05$, denotándoselas con distintas letras. Los datos fueron expresados como la media +/- el error estándar. Los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico Infostat, Universidad de Córdoba, Argentina.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Puesta a punto de la técnica de *pull-down* de Rac1 activado en células T-47D de cáncer de mama.

Como se ha mencionado en la introducción, Rac1 es una Rho GTPasa que alterna entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo, unido a GDP. La misma controla procesos celulares esenciales incluyendo la regulación del citoesqueleto de actina, la polaridad celular, la migración, la expresión génica y la proliferación celular (Jaffe & Hall 2005; Takai et al. 2001). Además, la hiperactivación de Rac1 está implicada en procesos de tumorigénesis y metástasis. Cuando Rac1 se encuentra activado se une a un conocido efector: PAK (quinasa activada por p-21). Más específicamente, Rac1 se une al dominio de unión a p-21 de PAK (p21-binding domain, PBD-PAK por sus siglas en inglés), provocando una autofosforilación de este efector, y dándole la capacidad de fosforilar sustratos en residuos de serina y treonina (Manser et al. 1994).

En este contexto, resulta de gran importancia entender las vías de señalización que llevan a la activación/inactivación de Rac1. Con este fin se llevó a cabo la puesta a punto en nuestro modelo (línea celular de cáncer de mama T-47D) de un ensayo de *pull-down* de Rac1 activado (Figura 3), desarrollado por Benard y colaboradores (Benard et al. 1999). Previo al ensayo, es necesaria la expresión en bacterias y purificación de una proteína de fusión conformada por PBD con una etiqueta de GST (Glutación S-transferasa). Una vez purificada, se determinó la concentración óptima de proteína recombinante necesaria para ver diferencias en activación de Rac y se estableció el tiempo de estimulación con HRG óptimo para ver la mayor activación de Rac.

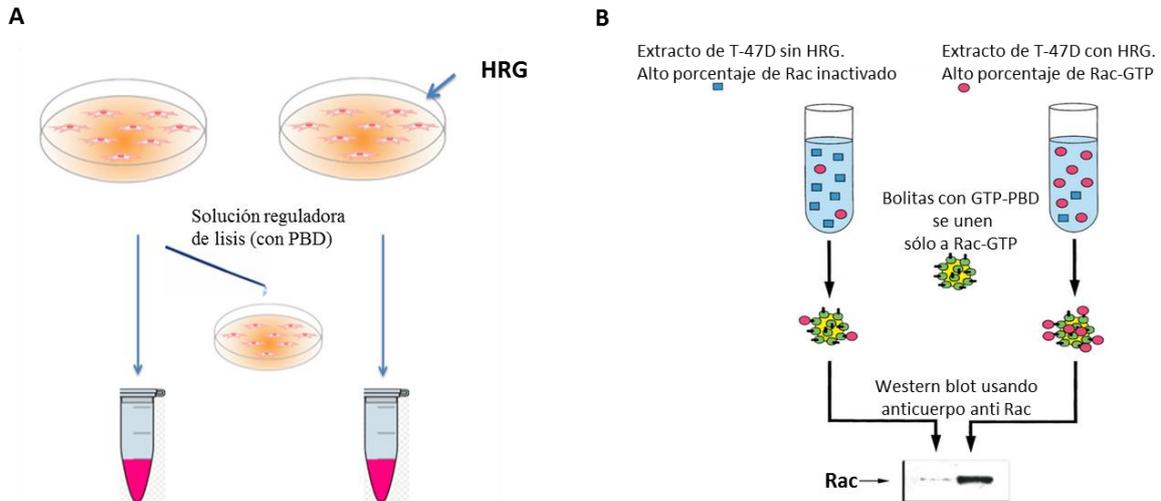


Figura 3: Esquema de la técnica de pull-down de Rac activado. A. Placas con células son estimuladas (o no) con HRG, para luego ser lisadas usando una solución reguladora que contiene GST-PBD. B. Los extractos celulares se ponen en contacto con bolitas de glutatión sefarosa, para unir mediante el GST-PBD al Rac activado, que luego es sometido a SDS-PAGE y western blot para su visualización.

A. Expresión de la proteína de fusión GST-PBD en bacterias *E. Coli*.

Como sistema de expresión de la proteína recombinante GST-PBD se utilizaron bacterias *E. coli* BL21, transformadas con el plásmido pGEXTK-PAK1 (Figura 4).

El plásmido pGEXTK-PAK1 cuenta con los siguientes elementos:

- Un origen de replicación del plásmido pBR322 para mantener el número de copias en las bacterias.
- El gen de resistencia a ampicilina: La ampicilina es un antibiótico beta-lactámico, que actúa interfiriendo en las últimas fases de la síntesis de peptidoglicano, componente necesario de la formación de la pared bacteriana. Este gen codifica enzimas llamadas beta-lactamasas que hidrolizan el enlace amida del núcleo beta-lactámico, inactivando el antibiótico antes de que genere cualquier efecto.
- La proteína de fusión GST-PBD se encuentra bajo el promotor derivado del operón Lac. La transcripción de esta proteína está constitutivamente inactiva, ya que el represor (codificado por el gen Lac I) se une río abajo a la región del operador, impidiendo que la ARN polimerasa lleve a cabo la transcripción. Cuando la lactosa está presente, ésta se une al represor, generando un cambio conformacional que hace

que pierda afinidad por la región del operador. De esta manera, la región operadora queda libre y la transcripción del gen río abajo del promotor se lleva a cabo.

Se repicó una colonia de estas bacterias en medio LB suplementado con ampicilina. Así, solo las bacterias que estuvieran transformadas con el plásmido pGEXTK-PAK1 pudieron crecer, ya que contaban con el gen de resistencia a este antibiótico.

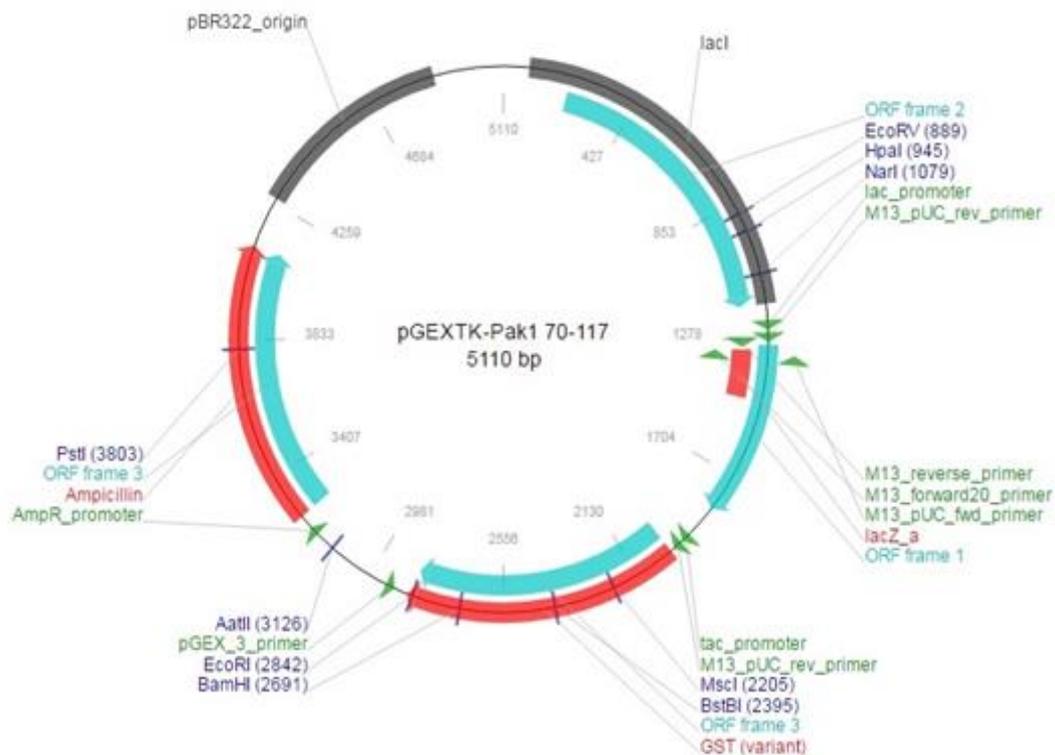


Figura 4: Esquema del plásmido pGEXTK-PAK1 usado para la expresión de la proteína recombinante GST-PBD en bacterias *E. coli* BL21. (<https://www.addgene.org/12217/>)

El cultivo fue estimulado durante 4 horas con IPTG (análogo no hidrolizable de la lactosa). Éste se une al represor del operón Lac, dando lugar a la transcripción del gen de la proteína de fusión y al no ser hidrolizable por las bacterias, mantiene su concentración constante durante todo el tiempo de inducción.

B. Purificación de la proteína recombinante GST-PBD.

Se centrifugó el cultivo de bacterias para obtener un *pellet* que fue resuspendido en PBS y sometido a ultrasonido mediante el uso de un sonicador, para liberar el contenido celular. Se procedió a centrifugar nuevamente para deshacerse de los restos celulares y que las proteínas solubles (entre ellas el GST-PBD) queden en el sobrenadante. Este sobrenadante se

incubó luego con bolitas de glutatión sefarosa. De esta manera, el glutatión de las bolitas se unió a la etiqueta de GST presente en la proteína recombinante. Se centrifugó luego el tubo, obteniendo un *pellet* con las bolitas unidas a PBD mediante su etiqueta, separándose del resto de proteínas solubles de la bacteria que quedaron en el sobrenadante. Lo siguiente, fue poner las bolitas en contacto con una solución que contenía glutatión reducido. Este glutatión se unió a la etiqueta de GST, desplazando al glutatión de las bolitas por competencia, y dejando a la proteína recombinante en solución. El último paso, consistió en quitar la sal de la solución en la que se encontraba la proteína recombinante, para que la misma pueda ser usada en los ensayos que se requiera. Para este fin se usaron columnas de desalado PD-10. Estas columnas contienen una resina (Sephadex G-25). Esta resina, compuesta por microesferas de dextrano en forma de gel, permite que entren en sus poros moléculas muy pequeñas como las de sal; pero la proteína recombinante que tiene mayor tamaño, no puede penetrar en los poros del gel, por lo que migra con mayor velocidad. Es por esta razón que requiere menor volumen de solución para poder recuperarse. Se procedió entonces a tomar la totalidad del volumen de la solución de elución y se la colocó dentro de la columna de desalado. El volumen que se introduce pasa a través de la columna por gravedad, y se descarta. Luego, para recuperar el PBD, se agregaron a la columna 3 mL de PBS. Este volumen fue suficiente para que la proteína recombinante pase a través de los poros de la columna, pero no así la sal que contenía la solución de elución.

C. Cuantificación de la proteína de fusión GST-PBD

Una vez obtenida la proteína se procedió a cuantificarla. Primero se llevó a cabo un SDS-PAGE en los que se sembró: 1) un marcador de peso molecular comercial que hiciera posible, por extrapolación, determinar el peso molecular de la proteína purificada; 2) tres concentraciones conocidas de BSA en orden creciente: 5 μg , 10 μg y 20 μg que hicieran posible la cuantificación, por comparación, de la proteína purificada; 3) dos concentraciones distintas de un extracto de bacterias luego de ser estimuladas con IPTG, previo a la purificación de la proteína recombinante; y 4) una muestra de la proteína purificada. Una vez terminada la corrida electroforética, el gel se tiñó con una solución que contenía azul de *coomassie*. Este colorante tiñe a las proteínas de color azul, lo que permite visualizar las bandas. El gel se colocó en un transiluminador para tomar una foto (Figura 5). Por extrapolación del marcador de peso molecular podemos comprobar la identidad de la proteína

purificada, ya que el peso molecular observado es de 34 kDa. También por comparación con la intensidad de las bandas de BSA, podemos deducir que en el gel hay aproximadamente 10 μ g de proteína recombinante ya que la intensidad es similar a la segunda concentración de BSA. Adicionalmente, para una cuantificación más precisa, se llevó a cabo una medición espectrofotométrica a una amplitud de onda (λ) de 280 nm y una medición por el ensayo de Bradford. Ambas corroboraron que la concentración estimada era correcta. En los extractos bacterianos se observan todas las proteínas presentes, incluyendo el GST-PBD. Cuando se compara dicha calle con la de proteínas después de la purificación, se observa que la proteína recombinante fue eficientemente separada del resto de las proteínas bacterianas. Es importante destacar que la proteína recombinante aparece como un cuadruplete. Este fenómeno ha sido descrito con anterioridad por otros laboratorios que llevan a cabo la técnica pero no se ha determinado el motivo de que haya más de una banda. Sin embargo, dicha observación no es considerada relevante para el ensayo de *pull-down*.

D. Puesta a punto de la concentración óptima de GST-PBD a utilizar en los ensayos de *pull-down* de Rac1 activado.

Lo siguiente, fue probar la funcionalidad de la proteína recombinante y su capacidad de unión a Rac activado. Simultáneamente, se buscó determinar la cantidad de GST-PBD necesaria para unirse a todo el Rac activado que hubiera en las muestras. Esto es importante porque si no hay GST-PBD en exceso en los ensayos, no se pueden ver diferencias reales de activación de Rac entre tratamientos.

Como se mencionó previamente, la HRG es un factor de crecimiento capaz de unirse al receptor de membrana ErbB3 en células T-47D. Éste forma un heterodímero con ErbB2, desencadenándose fosforilaciones cruzadas de los residuos de tirosina presentes en los dominios citoplasmáticos de estos receptores. Esta señal, a través de la coactivación de CXCR4 (un receptor de membrana acoplados a proteína G), activa a PI3K γ , cuyo producto, PIP3, activa al Rac-GEF P-Rex1 (Sosa et al. 2010). P-Rex1 promueve el cambio de Rac-GDP (inactivo) a Rac-GTP (activo) (revisado en Wertheimer et al. 2012). Adicionalmente, el complejo ErbB2:ErbB3 activa una respuesta mitogénica a través de la vía de señalización de las MAP quinasas como ERK1 (Karunagaran et al. 1996).

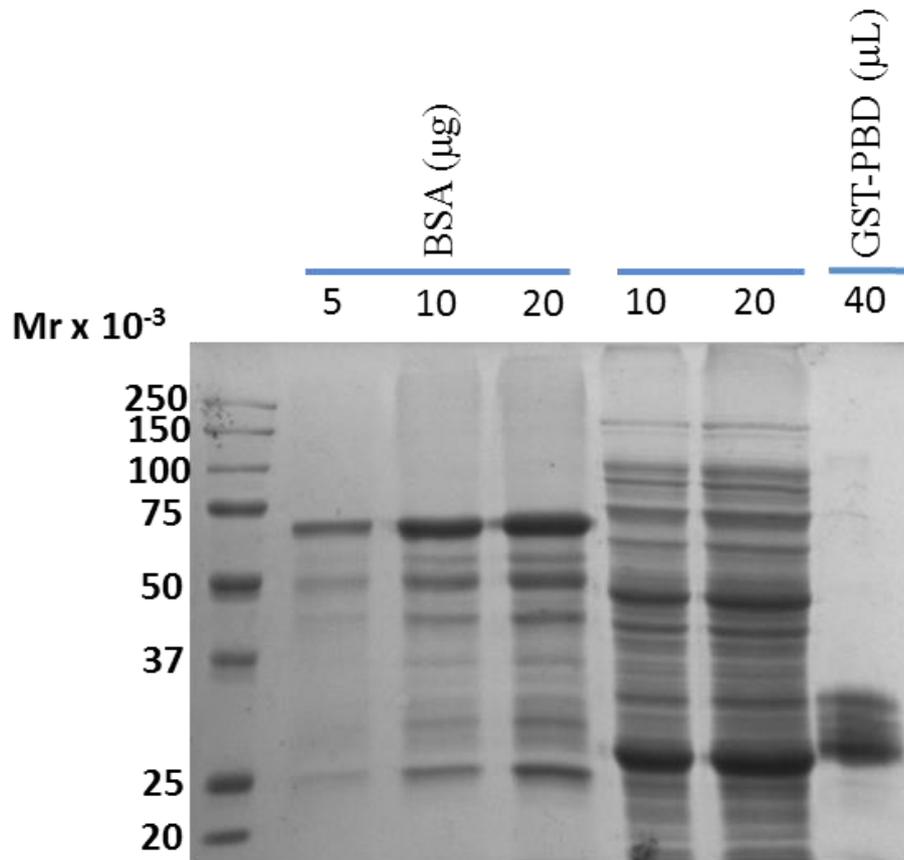


Figura 5: Identificación y cuantificación del GST-PBD expresado en *E. Coli* BL21 y purificado. La proteína recombinante fue expresada, y luego de purificada sometida a SDS-PAGE. En paralelo se corrieron distintas concentraciones de BSA y un extracto total de proteínas de las bacterias expresando el GST-PBD. El gel fue teñido con azul de *coomasie* para su visualización.

Se utilizaron dos grupos de células T-47D estimuladas o no con 10 ng/mL de HRG durante 5 minutos. Cada par de placas se puso en contacto con una concentración diferente de GST-PBD: un par con 3 µg de PBD y el otro con 5 µg. Luego se realizó el ensayo de *pull-down* de Rac activado en cada condición. Adicionalmente, para controlar el correcto funcionamiento de la HRG, se determinó el efecto de la misma sobre la fosforilación de ERK 1/2 y se observó que el estímulo por 5 minutos con HRG, induce un aumento en la cantidad de ERK 1/2 fosforilado (Figura 6, panel inferior). De esta forma verificamos que la HRG utilizada en los ensayos era capaz de activar de la vía de ErbBs. Por otro lado, no puede observarse un aumento en la activación de Rac1 luego del estímulo con HRG, utilizando 3 µg de PBD por tratamiento. Por el contrario, utilizando 5 µg de PBD por tratamiento, la diferencia en la cantidad de Rac-GTP entre estos es evidente siendo la cantidad de Rac total

igual en ambos grupos (Figura 6). A partir de estos resultados se determinó que se utilizarían 5 μ g de GST-PBD por ensayo en experimentos subsiguientes.

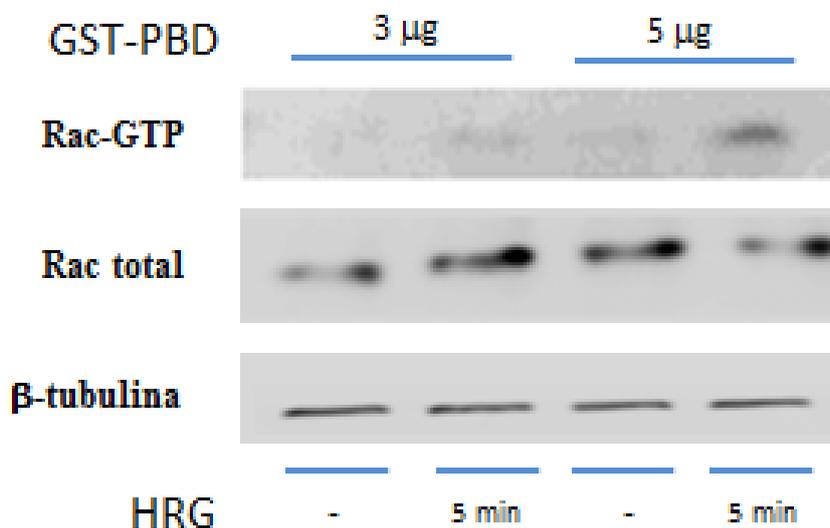


Figura 6: Puesta a punto de la cantidad de GST-PBD a usar en cada ensayo de *pull-down* de Rac activado. Dos pares de placas con células T-47D fueron estimuladas (o no) con 10 ng/mL de HRG por 5 minutos. Cada par de placas se pone en contacto con una cantidad de PBD diferente (3 μ g o 5 μ g). Se realiza el ensayo de *pull-down* de Rac, en el que se determina que son necesarios 5 mg de GST-PBD para ver activación de Rac. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes.

E. Optimización del tiempo de estímulo con HRG necesario para ver una mayor activación de Rac1.

Habitualmente, cuando se quiere ver la activación de Rac1 en diferentes condiciones, se usa un tiempo de 5 minutos de estímulo de HRG, ya que se ha visto que con éste tiempo hay una fuerte activación de Rac1 (Yang et al. 2006). Para comprobar que en nuestras condiciones esto seguía siendo así, se llevó a cabo un ensayo de *pull-down* de Rac activado, pero esta vez, variando el tiempo de estímulo con HRG. Se utilizaron tres tiempos de estimulación con HRG: 3, 5 y 10 minutos. Luego se llevó a cabo el ensayo de *pull-down*, con las condiciones que se determinaron en el punto anterior. Como fue previamente reportado, la mayor activación de Rac1 se da a los 5 minutos de estímulo con HRG, comparado con 3 minutos y con 10 minutos de estímulo (Figura 7). En cuanto a la fosforilación de ERK, no se observan diferencias entre los distintos tiempos de estímulo.

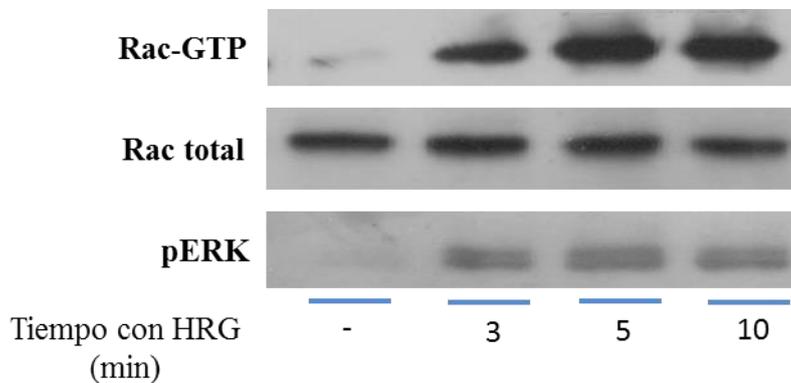


Figura 7: Estímulos cortos con HRG. Células T-47D fueron estimuladas durante tiempos cortos (3, 5 y 10 minutos) con 10 ng/mL de HRG. Se realizaron ensayos de pull-down para determinar la activación de Rac en cada caso. En paralelo se determinó el nivel de activación de ERK (pERK) como control del estímulo. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes.

Objetivo específico 2: Determinar las condiciones experimentales para medir niveles de ARN mensajero de TGFβ2 por PCR cuantitativa en tiempo real.

A partir del *microarray* realizado por la Dra. Wertheimer (Barrio-Real et al. 2016), surgió la evidencia de que TGFβ2 aumentaba sus niveles de ARN mensajero cuando se estimulaban células de cáncer T-47D durante 6 horas con 10 ng/mL de HRG, y que ese aumento era dependiente de la presencia de P-Rex1 en las células. Como estos datos surgen del uso de una técnica de alto rendimiento, como es el *microarray*, era necesario validar la información obtenida. Una forma apropiada de validación es llevar a cabo una PCR en tiempo real en las mismas condiciones del experimento original.

Para lograr este objetivo se diseñaron *primers* específicos para TGFβ2 (gen de interés) y para 18S (gen de referencia). Luego fue necesario calcular la eficiencia de estos *primers* en la reacción de PCR en tiempo real y por último, validar el método de $\Delta\Delta C_T$ para la cuantificación de los datos obtenidos.

A. Diseño de *primers* específicos para TGFβ2 y 18S.

Para el diseño de los *primers* específicos para TGFβ2 y 18S se siguió el método descrito por Thornton y Basu (Thornton & Basu 2011). La secuencia nucleotídica del ARN mensajero de ambos genes fue obtenida de la base de datos de NCBI (NIH) y a partir de la secuencia en formato FASTA, se procedió a hacer uso de la herramienta en línea para diseño

de *primers*: Primer3 (Untergasser et al. 2012; Koressaar & Remm 2007). El programa permite controlar las variables pertinentes: longitud del producto y de los *primers*, temperatura de *melting* del producto y de los *primers*, máxima complementariedad permitida entre *primers*, concentración de cationes divalentes en la reacción de PCR. Así se obtuvieron pares de *primers* que cumplieron con los requerimientos básicos necesarios para ser usados en una reacción de PCR en tiempo real. El primer requerimiento está relacionado con la especificidad: si el par de *primers* está pobremente diseñado, se unirá al templado de forma inespecífica y al usarse un colorante fluorescente que se une a dobles cadenas de ADN, el mismo se unirá tanto a producto específico como inespecífico. El segundo requerimiento es la ausencia de estructuras secundarias dentro de un *primer* o entre los *primers* del par. El cumplimiento de este requerimiento tendrá un impacto positivo en la eficiencia de la reacción de PCR. La ausencia de estructuras secundarias fue corroborada usando la herramienta en línea Beacon Designer (Premier Biosoft). En este programa se ingresó la secuencia nucleotídica de los *primers* sentido y anti-sentido, obteniendo *in silico* las estructuras secundarias que se formarían durante la reacción de Q-PCR. Se eligió el par de *primers* que no formara ninguna estructura secundaria. En los casos en los que no era posible cumplir con dicha condición, se eligieron aquellos pares de *primers* cuya energía libre de Gibbs de las estructuras secundarias que formarían, no fuera significativa (menor que -3,5 kcal/mol), lo cual implica que no es una reacción espontánea. Por último, se corroboró que no haya estructuras secundarias en el producto de la reacción de PCR, utilizando el programa UNAFold (Markham & Zuker 2008).

Teniendo en cuenta las condiciones mencionadas se obtuvieron los pares de *primers* detallados en la Tabla 1.

Tabla I: Secuencia nucleotídica de los *primers* sentido y anti-sentido obtenidos para TGFβ2 y 18S a partir de Primer3.

Transcripto	<i>Primer</i> sentido	<i>Primer</i> anti-sentido
TGFβ2	ACG TTCAGAAGTCGG	ATGTCTCAGTGGATG
18S	GTAACCCGTTGAACC	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

B. Cálculo de la eficiencia de los *primers* en la reacción de PCR en tiempo real.

La eficiencia en una reacción de PCR, se define como la fracción de moléculas diana que son copiadas en un ciclo de PCR. Este parámetro se mide en términos de porcentaje, siendo una reacción con 100% de eficiencia, aquella en la que hay una duplicación del templado de ADN en cada ciclo de la PCR. Para una correcta cuantificación de la muestra es necesario conocer la eficiencia de la reacción. El valor de la eficiencia debe ser $100 \pm 10\%$. La eficiencia depende de varios factores, incluyendo la secuencia y estructura de los *primers* y el templado, la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción, los reactivos usados y su concentración, entre otros (Svec et al. 2015).

Para determinar la eficiencia de los *primers* diseñados, se realizó una curva estándar de concentración de templado. La estimación de la eficiencia de la reacción de PCR por medio de una curva estándar, implica generar una serie de muestras con cantidades relativas de templado. En nuestro caso, fue llevada a cabo una retrotranscripción a partir de $1 \mu\text{g}$ de ARNm de células T-47D. El ADNc obtenido constituyó nuestra solución stock, a partir de la cual se hicieron 5 diluciones logarítmicas: 1/10, 1/30, 1/100, 1/300 y 1/1000. Luego se procedió a analizar estas muestras en reacciones de PCR en tiempo real, en las condiciones detalladas en la sección de métodos, utilizando los *primers* descriptos. Finalizado el análisis de las muestras por Q-PCR, se obtienen valores de C_T para cada una. El C_T representa el número de ciclos que fueron necesarios para detectar una señal real (sobre la señal ruido) en dicha muestra. Estos valores, son inversamente proporcionales a la cantidad inicial de ADNc. Usando los valores de C_T , el software del equipo de Q-PCR, construye un gráfico de C_T versus el logaritmo de las concentraciones de templado que se espera sea lineal con una pendiente negativa. El valor de esa pendiente se usa en la ecuación (1) para estimar el valor de la eficiencia de la reacción:

$$E=10^{(-1/\text{pendiente})-1} \quad (1)$$

La eficiencia toma el valor de 100% cuando la pendiente es de -3,3. En el caso de TGF β 2 (Figura 8.A), la pendiente toma un valor de -3,349 y la eficiencia es del 99%., En el caso de 18S (Figura 8.B), la pendiente es de -3,382 y la eficiencia toma un valor de 98%.

Dichas eficiencias confirman que podemos usar estos pares de *primers* para la cuantificación del gen de interés en una reacción de Q-PCR.

De los resultados obtenidos también se determinó que la dilución óptima para los futuros ensayos con muestras experimentales sería la de 1/100, ya que con dicha dilución sería posible detectar tanto aumentos como disminuciones de las cantidades relativas de TGFβ2 provocados por los tratamientos.

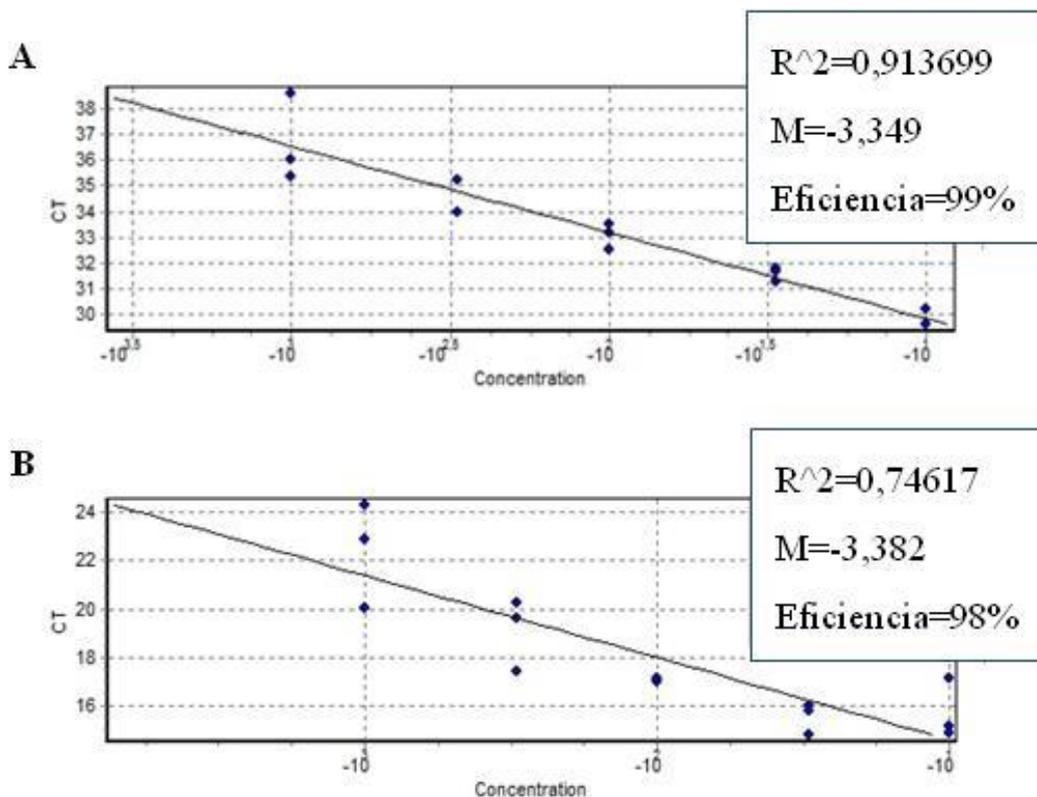


Figura 8: Curva estándar de dilución de ADNc vs C_T para TGFβ2 y 18s. ADNc proveniente de células T-47D fue diluido (de 1/10 a 1/1000) y utilizado en una reacción de Q-PCR con un par de *primers* específicos para cada gen. **A.** Curva estándar para TGFβ2. **B.** Curva estándar para 18S. Se muestran figuras representativas de tres experimentos independientes, con tres replicas por punto.

C. Validación del método de $\Delta\Delta C_T$.

Uno de los métodos más usados a la hora de analizar datos provenientes de experimentos de Q-PCR es la cuantificación relativa. A diferencia de la cuantificación absoluta, el objetivo no es determinar el número de copias de partida del gen de interés, sino describir el cambio en la expresión del mismo, relativo a un grupo de referencia. En este sentido, el método de $\Delta\Delta C_T$, es una manera conveniente de analizar los cambios relativos en

la expresión de un gen de interés. Para que el cálculo por el método de $\Delta\Delta C_T$ sea válido, hay un supuesto que se debe cumplir: las eficiencias de amplificación del gen de interés y del gen de referencia deben ser aproximadamente iguales. Un método sensible para evaluar si dos amplicones se producen con la misma eficiencia, es ver cómo varía el ΔC_T con la dilución del templado.

A partir de los datos de C_T obtenidos para cada punto de la curva estándar se determinó el ΔC_T , que resulta de restar al C_T del gen de interés el C_T del gen de referencia (ecuación 2):

$$\Delta C_T = C_{T \text{ gen de interés}} - C_{T \text{ gen de referencia}} \quad (2)$$

Luego se realizó un gráfico del logaritmo de la concentración del ADNc versus el ΔC_T . Si el valor de la pendiente es cercano a cero ($0 \pm 0,05$) las eficiencias del gen de interés y de referencia son similares, y se puede usar el método de $\Delta\Delta C_T$ para la cuantificación relativa del gen de interés. La pendiente del gráfico de ΔC_T de TGF β 2 y 18S versus el logaritmo de la concentración del ADNc es de 0,0465 (Figura 9). Como el valor es cercano a cero, se considera válido hacer uso de método de $\Delta\Delta C_T$ para la cuantificación relativa de los niveles de TGF β 2 en las distintas muestras.

Los experimentos de *microarray* de ADN generan miles de mediciones de expresión génica (determinada a partir de niveles de ARNm), siendo muy útiles para recopilar información a gran escala acerca de tejidos y células. Sin embargo, es necesaria una técnica confirmatoria a menor escala para validar los datos de expresión génica obtenidos. En este sentido, la PCR en tiempo real, es la herramienta más usada.

Como se mencionó anteriormente, el *microarray* de expresión se realizó con el propósito de identificar el patrón de expresión génica que se desencadena cuando se estimula a células T-47D con 10 ng/mL de HRG durante 6 horas (lo cual mimificaría un efecto crónico de la HRG). También se buscó determinar la contribución de P-Rex1 a dicho patrón. Bajo esas condiciones se observó que HRG inducía un aumento en los niveles del mensajero de TGF β 2 y que dicho aumento era significativamente menor cuando P-Rex1 era silenciado (Figura 10.A).

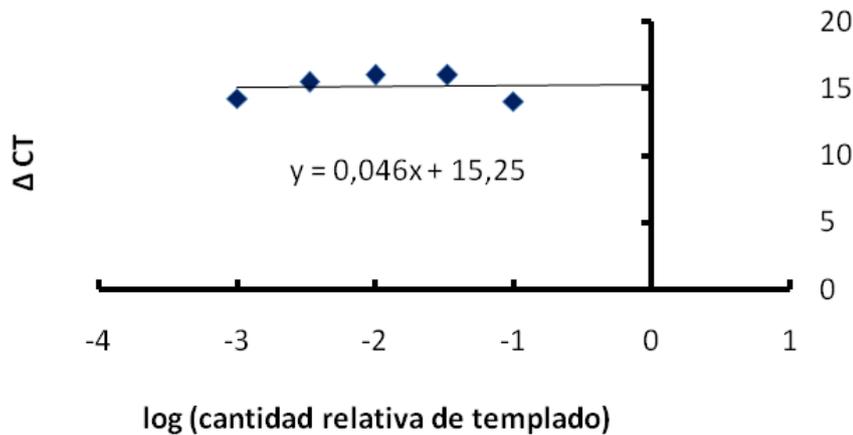


Figura 9: Validación del método de $\Delta\Delta C_T$. Se realizaron Q-PCRs con *primers* específicos para TGF β 2 y 18S usando 5 diluciones (1/10, 1/30, 1/100, 1/300 y 1/1000) de muestras de ADNc provenientes de células T-47D. Los valores de ΔC_T se obtuvieron substrayendo los valores de C_T obtenidos para el gen de referencia (18S) a los valores de C_T del gen de interés (TGF β 2). Se construyó una recta de los ΔC_T en función del log de la cantidad relativa de templado. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes.

Para validar los datos obtenidos del *microarray*, se estimularon células T-47D con HRG durante 6 horas y se realizó una comparación con células control sin estímulo. De cada placa se extrajo ARN total, que se utilizó para obtener el ADNc para la Q-PCR. Bajo estas condiciones, los niveles de ARNm aumentaron luego de estimularlas con HRG por 6 horas. El incremento fue de 3 veces de cambio con respecto a las células no estimuladas. (Figura 10.B). Estos resultados se condicen con los obtenidos por el *microarray* para TGF β 2.

Para determinar la participación de P-Rex1 en el aumento de los niveles de ARNm de TGF β 2 por estímulo de HRG, decidimos evaluar la eficiencia del silenciamiento de P-Rex1 en nuestras condiciones de trabajo. Se usaron células T-47D que fueron transfectadas con dos dupletes distintos de ARNi (#1 y #2) con secuencias específicas para P-Rex1. Como control, se usó una placa denominada “Parental” que sólo contenía las células T-47D con medio y una placa denominada *non-target* (NT) que fue transfectada con un ARNi de secuencia no específica.

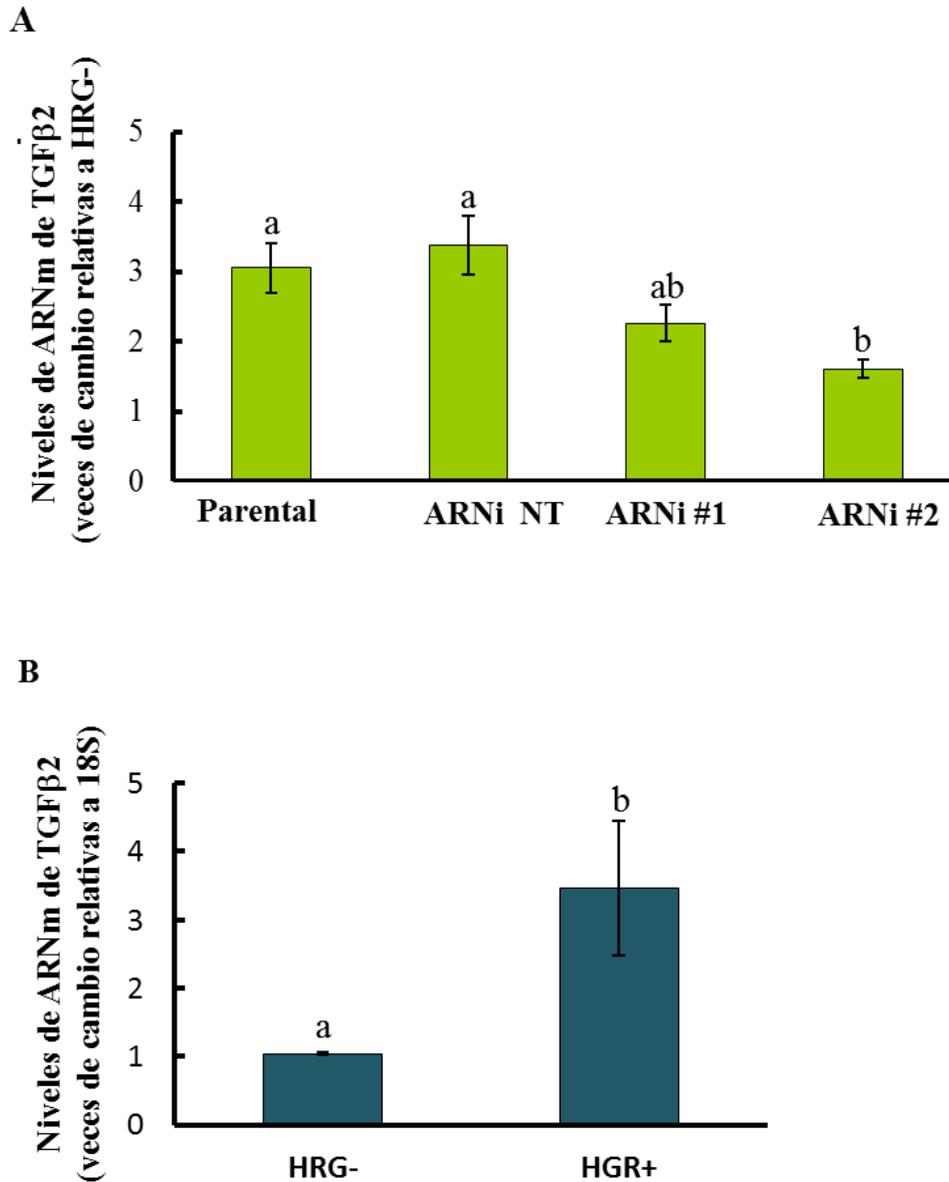


Figura 10: Expresión de TGFβ2 dependiente de HRG en células T-47D. **A.** Datos de un *microarray* de expresión. Después del silenciamiento por ARNi de P-Rex1, las células T-47D se incubaron con (HRG+) o sin (HRG-) HRG durante 6 horas. El perfil de expresión génica se llevó a cabo utilizando un *microarray* Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST. **B.** Validación de datos del *microarray*. Los niveles de ARNm de TGFβ2 se obtuvieron mediante Q-PCR realizada a ADNc proveniente de células T-47D antes y después de 6 horas de incubación con HRG. Cada experimento fue repetido al menos tres veces. Se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey para analizar los datos del *microarray*. Se realizó un T-Student para analizar los datos de Q-PCR. Las medias de los grupos que tienen diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$).

En el *western blot* correspondiente al silenciamiento de P-Rex1 (Figura 11) puede observarse que hay una marcada disminución de la proteína P-Rex1 luego de un silenciamiento transiente con ambos dupletes de ARNi.

Futuros experimentos de Q-PCR de células con P-Rex1 silenciado determinarán si existe una regulación de la expresión de TGFβ2 dependiente de P-Rex1 como se observa en los resultados del *microarray*.

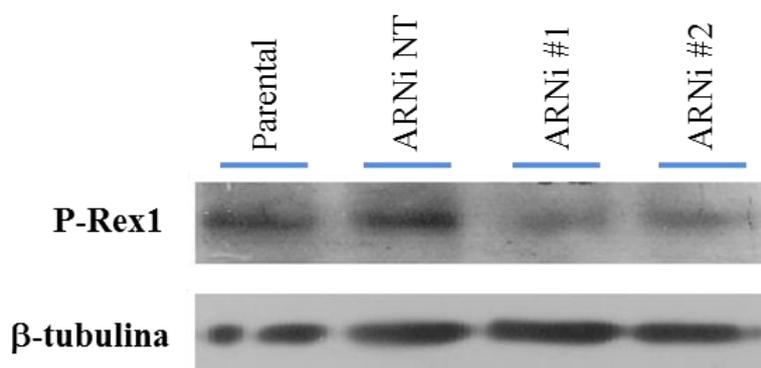


Figura 11: Silenciamiento de P-rex1. Células T-47D fueron transfectadas con dos dupletes validados de ARNi específicos para P-Rex1 (#1 y#2) y con un duplete no específico (NT). Las células parentales se usaron a modo de control del ARNi no específico y no fueron transfectadas. En las células transfectadas con los dupletes de ARNi, hay una ausencia casi total de la proteína P-Rex1. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes.

Objetivo específico 3: Evaluar la temporalidad de activación de Rac y del aumento de TGFβ2 inducidos por HRG en células de cáncer de mama T-47D.

Una vez que se optimizaron las condiciones para medir la activación de Rac y los niveles de ARNm de TGFβ2, nos focalizamos en profundizar el análisis de las vías de señalización que llevan a la activación de Rac por HRG y la dinámica temporal del aumento en la expresión de TGFβ2 en células T-47D de cáncer de mama.

A. Determinación de los niveles de Rac-GTP en el tiempo.

Las células T-47D estimuladas con 10 ng/mL de HRG manifiestan un pico de activación de Rac luego de 5 minutos de aplicado el estímulo, y los niveles de Rac-GTP se mantienen elevados (72% del máximo) a los 60 minutos posteriores al estímulo (C Yang et al. 2006). Con el fin de determinar las dinámicas de activación de Rac a tiempos largos de estimulación, se incubaron células T-47D con HRG durante distintos tiempos: 5, 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos. Transcurrido el tiempo pertinente se extrajeron las proteínas y se llevó a cabo un ensayo de *pull-down* de Rac-GTP para cada tratamiento. Las proteínas fueron sometidas a PAGE y *western blot* con un anticuerpo anti-Rac1. Se observó un pico de Rac-GTP a partir de los 5 minutos que se mantiene hasta las 2 horas de estimulación. A partir de ese momento y hasta las 6 horas, los niveles de Rac activado descienden significativamente, sin llegar a los niveles basales de activación (37% el máximo) (Figura 12, panel superior).

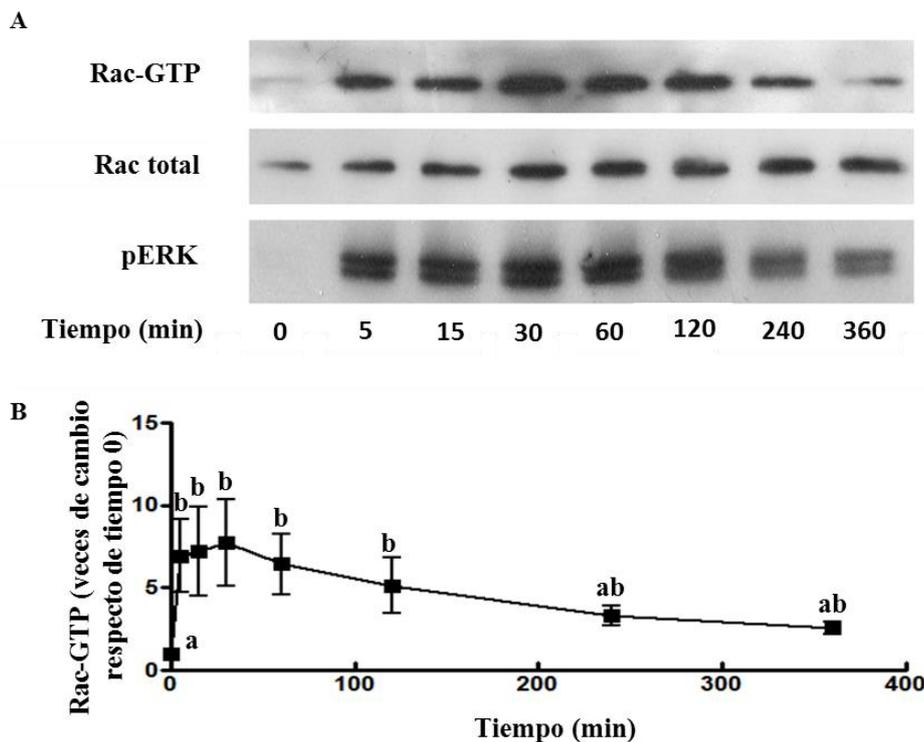


Figura 12: Curva temporal de activación de Rac inducida por HRG en células T-47D. A. Después de una incubación con HRG por diferentes períodos de tiempo, se usaron los lisados celulares para llevar a cabo un *pull-down* de Rac activado y posterior *Western Blot*. **B.** Análisis densitométrico del *western blot* usando Image J. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes. Se realizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las medias de los grupos con distintas letras, difieren significativamente ($p < 0.05$).

involucradas que, por algún mecanismo aun no dilucidado, impiden el mantenimiento de la activación de Rac incluso cuando la HRG está disponible.

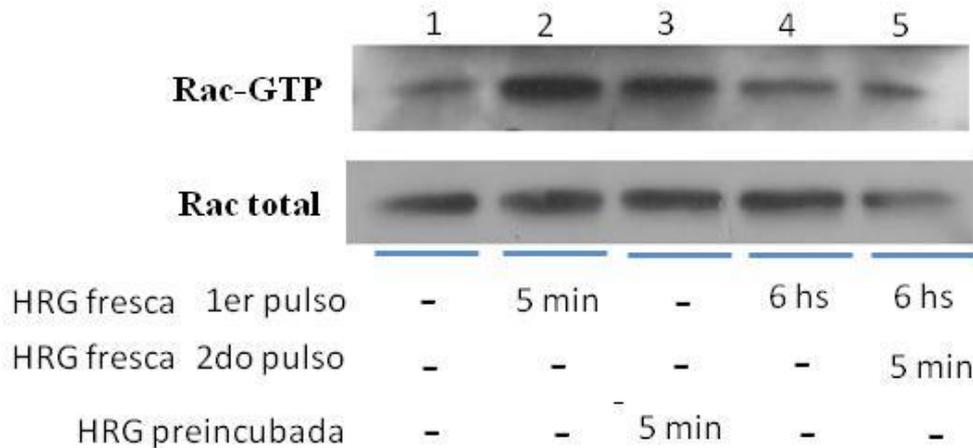


Figura 14: Determinación de la eficiencia de HRG para activar Rac luego de 6 horas a 37°C. Pull-down de Rac activado de células estimuladas con HRG en distintas condiciones: 1) no estímulo; 2) un pulso de 5 min de HRG fresca; 3) un pulso de 5 min de HRG preincubada por 6 horas a 37°C; 4) incubación de 6 horas con HRG fresca; y 5) incubación de 6 horas de HRG fresca + un segundo pulso de 5 min de HRG fresca. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes.

B. Determinación de los niveles de ARN mensajero de TGFβ2 en el tiempo.

Los datos del *microarray* indicaban que los niveles de ARN mensajero de TGFβ2 aumentaban 3 veces (en términos de veces de cambio) en células T-47D estimuladas por 6 horas con HRG, comparadas con células control sin estimular. Para determinar la dinámica temporal de este aumento, se usaron células T-47D estimuladas con HRG durante los mismos tiempos que el experimento anterior: 5, 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos. Se extrajo el ARN total de cada placa, y se determinaron los niveles de ARNm de TGFβ2 en cada tiempo (Figura 15). Los niveles de ARNm de TGFβ2 aumentaron significativamente a partir de los 30 minutos de estímulo con HRG. A las 2 horas se observó un aumento abrupto de TGFβ2 que alcanzó un pico 5 veces mayor que el nivel basal sin estímulo, luego los niveles disminuyeron hacia las 6 horas sin llegar a los niveles basales de expresión. Dichos

resultados sugieren que existe una relación secuencial entre la activación de Rac y el aumento de ARNm de TGFβ2.

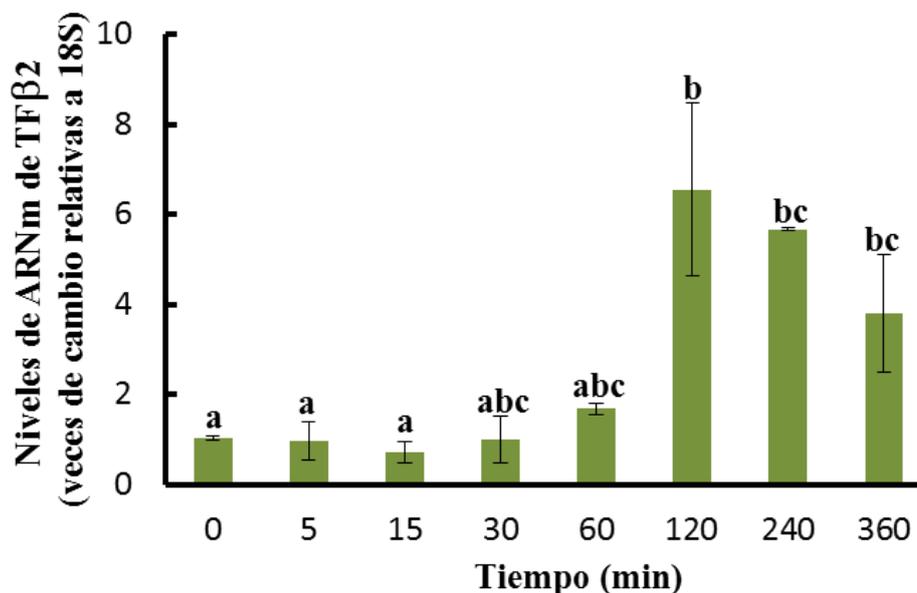


Figura 15: Niveles de ARN mensajero de TGFβ2 en el tiempo, luego de un estímulo con HRG en células T-47D. Se usó el ADNc proveniente de células incubadas con HRG por distintos períodos de tiempo para realizar Q-PCRs. Cada punto fue repetido al menos 3 veces. Los datos fueron analizados con el test de Newman Keuls. Las medias de grupos con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La unión de ligandos HRG a los receptores ErbB3 induce la activación de Rac necesaria para promover cambios en el patrón de expresión de un gran número de genes (Barrio Real 2016). El mismo estudio de microarray reveló que P-Rex1, un GEF de Rac1, es necesario para la expresión de algunos de estos genes, en particular, aquellos relacionados con la migración celular. Entre ellos, TGFβ2 aumenta su expresión en células T-47D luego de un estímulo con HRG siendo este aumento abolido cuando P-Rex1 es silenciado. TGFβ2 pertenece a la familia de citoquinas TGFβ, que son potentes reguladores del crecimiento celular y de la migración. Fallas en su mecanismo de señalización han sido relacionadas en una variedad de cánceres humanos.

En este trabajo, nos propusimos como objetivo general desarrollar las estrategias experimentales necesarias para estudiar el efecto del aumento en la expresión de TGF β 2, producido por la activación de los receptores ErbB, sobre la progresión del cáncer de mama. Los objetivos específicos fueron: 1) Poner a punto la técnica de *pull-down* para medir Rac activado en células T-47D, 2) Determinar las condiciones necesarias para medir niveles de ARNm de TGF β 2 por PCR en tiempo real y 3) Evaluar la temporalidad de la activación de Rac y del aumento de TGF β 2 inducidos por HRG. Para dicho fin, se expresó y purificó la proteína recombinante GST-PBD en bacterias, que fue utilizada en ensayos de *pull-down* de Rac1 activado. En este sentido, logramos determinar la cantidad óptima de GST-PBD a usar por ensayo, junto con el tiempo óptimo para ver una fuerte activación de Rac1. A la hora de poner a punto la cantidad de GST-PBD a utilizar por ensayo, encontramos que otros laboratorios reportan haber usado 8 μ g de la misma por tratamiento (Wang & Kazanietz 2002). Éste es un parámetro a ajustar muy importante, ya que el defecto de GST-PBD en un ensayo, haría que aquellas moléculas de Rac activado que no lograron unirse al GST-PBD presente, se fueran con el resto de las proteínas luego del lavado de las bolitas y obteniendo, por ende, valores de activación menores a los reales. En nuestro caso, observamos que con 5 μ g de GST-PBD logramos ver una buena activación de Rac ante 5 minutos de estímulo con HRG. Asimismo, probamos con concentraciones mayores (7 μ g y 10 μ g) de GST-PBD por tratamiento, y no observamos mayores diferencias en los niveles de activación de Rac (datos no mostrados). Por esa razón decidimos usar 5 μ g de GST-PBD en los ensayos de *pull-down* subsiguientes.

El método utilizado para determinar el estado de activación de Rac en nuestro modelo fue el ensayo de *pull-down* con un sustrato de Rac (PBD-PAK) unido a una etiqueta de GST. Sin embargo, se han reportado otros métodos para cuantificar los niveles de activación de pequeñas GTPasas. Un método clásico para analizar la activación directa de GTPasas consiste en medir la relación GTP:GDP luego de marcar a las células con 32 P (isótopo radioactivo del fósforo) e inmunoprecipitar la GTPasa (Benard & Bokoch 2002). Además de la necesidad de isotopos radioactivos, este enfoque está limitado por la disponibilidad de anticuerpos eficientes para realizar la inmunoprecipitación y por la rápida alternancia entre las formas unidas a GDP y a GTP. La gran ventaja del ensayo de *pull-down* de Rac activado, es que es una manera directa de medir la activación de la GTPasa, sin necesidad de la utilización de

radioactivos ni grandes cantidades de anticuerpos específicos. Sin embargo, este ensayo requiere la expresión y purificación previa de la proteína recombinante GST-PBD en bacterias, y además es una técnica laboriosa, con poca sensibilidad al momento de ver pequeños cambios en la actividad. Existen además, métodos indirectos de medir la activación de Rac, que requieren la co-transfección de las células con una construcción conteniendo una proteína de fusión que consiste en el dominio de activación de cJUN o SRF (sustratos de Rac1) y el dominio de unión a ADN (DBD) de Gal4, y un plásmido reportero con lucifereasa bajo un promotor de Gal4 (Abidi et al. 2007). Si bien es una técnica indirecta de medición, tiene la gran ventaja de que se puede manejar un mayor número de muestras en simultáneo. Será de gran utilidad, incorporar esta técnica al laboratorio en un futuro cercano como técnica complementaria al *pull-down*.

Por otro lado se diseñaron *primers* específicos para TGFβ2 y un gen de referencia 18S, y se comprobó su eficiencia para ser usados en reacciones de Q-PCR. Por medio de la técnica de Q-PCR confirmamos que HRG induce un aumento en los niveles del ARNm de TGFβ2. Cabe destacar que para el análisis de los datos provenientes de Q-PCR, existen dos métodos de cuantificación: el de cuantificación absoluta y el de cuantificación relativa. La cuantificación absoluta determina el número de copias inicial del transcripto de interés, generalmente relativizando la señal de la Q-PCR a una curva estándar. La cuantificación relativa describe cambios en la expresión de un gen de interés, relativos a algún grupo de referencia como una muestra sin tratamiento, o la muestra en el tiempo cero en un estudio de curso temporal (Livak & Schmittgen 2001). La cuantificación absoluta debería llevarse a cabo en situaciones en las que es necesario determinar el número absoluto de transcriptos, como por ejemplo, para determinar la carga viral. La cuantificación absoluta requiere la utilización de mayor cantidad de DNA y de reactivos, ya que cada experimento supone una curva estándar de concentración de DNA propia. En nuestro caso, decidimos utilizar la cuantificación relativa, ya que resulta innecesario determinar el número absoluto de transcriptos. De esta forma, observamos que los niveles de ARNm de TGFβ2 aumentan 3 veces con un estímulo de 6 horas con HRG. Consistentemente, estas veces de cambio coinciden con los datos obtenidos del análisis del microarray. Es importante mencionar que los cambios observados en los niveles de ARNm de TGFβ2 no son suficiente evidencia para establecer que TGFβ2 tenga un rol en la señalización de células de cáncer de mama

dependiente de ErbBs, ya que dichos datos deberían tener su correlato a nivel de proteína. Futuros experimentos explorarán si existen variaciones en los niveles proteicos de TGFβ2.

Una vez que las técnicas fueron optimizadas, nos dedicamos a responder preguntas puntuales relacionadas con las vías de señalización gatilladas por HRG. La activación de Rac por HRG en células T47D produce un aumento en la formación de lamelipodios (protrusiones de la membrana plasmática de las células que se producen por remodelación de los filamentos de actina y que facilitan la migración) e induce migración celular (Sosa et al. 2010). Por otro lado, los efectos de HRG sobre el patrón de expresión génica fueron determinados luego de 6 horas de estimulación y para algunos genes, como MMP10, el efecto era dependiente de Rac1 (L. Barrio-Real et al. 2016). Teniendo en cuenta estos antecedentes nos preguntamos si los efectos observados dependían de una activación constante de Rac. Para responder a dicho interrogante, lo primero que hicimos fue determinar la dinámica de activación de Rac durante las 6 horas de estimulación con HRG. Al realizar curvas de tiempo con estímulos de HRG en células T-47D, observamos que se induce una activación de Rac1 con un pico a los 5 minutos que se mantuvo hasta las 2 horas, y luego bajó hasta llegar a un 37% del máximo de activación a las 6 horas de realizado el estímulo. Nos planteamos que esta disminución en los niveles de Rac-GTP podía estar dada por la degradación de la HRG a través de las 6 horas del ensayo. Nuestros experimentos sugieren que la disminución de la activación de Rac, no se debe a una menor disponibilidad de la HRG por su degradación, sino a un mecanismo intrínseco de señalización; ya que el agregado de HRG fresca luego de 6 horas de incubación en presencia del estímulo no aumenta la proporción de Rac activado.

Dado que el proceso principal que regula la cinética de transducción de señales por receptores tirosina quinasa, es la eliminación endocítica de complejos activos ligando-receptor de la superficie celular (Waterman & Yarden 2001), nos planteamos la posibilidad de que los receptores ErbB3 (a los que se une la HRG) podrían estar siendo endocitados, apagando así la vía de señalización que activa a Rac. En este sentido, ErbB1 es rápidamente endocitado luego de unirse a su ligando EGF (Waterman & Yarden 2001). Sin embargo, los receptores ErbB3 y los receptores ErbB4 son altamente deficientes en mediar la internalización por ligando (Baulida et al. 1996). Un ligando puede inducir la degradación del receptor sin internalización, por activación de proteasas de la superficie celular. Sin embargo, la vida media de ErbB4 en presencia y ausencia de HRG es de 5,5 y 5 horas, respectivamente (Baulida et al. 1996). Lo que indica que la HRG no representaría un cambio metabólico

relevante, al menos para el receptor ErbB4. No hay evidencias de estos mecanismos para ErbB3. Otra hipótesis que nos planteamos, es la posibilidad de que el descenso en los niveles de Rac-GTP hacia las 6 horas esté dado por la activación de GAPs. Los GAP aceleran la actividad GTPasa intrínseca de las pequeñas GTPasas en varios órdenes de magnitud. Algunos Rac-GAPs son rigurosamente regulados por la estimulación del receptor. Por ejemplo, el Rac-GAP quimerina, es activado por el segundo mensajero lípidico diacilglicerol (DAG) generado en respuesta a la estimulación con EGFR del receptor del factor de crecimiento (ErbB1). DAG se une a las quimerinas para promover su redistribución a la membrana plasmática, donde se unen a Rac activo unido a GTP y aceleran la hidrólisis del nucleótido a GDP (Kazanietz 2000; H. Wang et al. 2006). Investigaciones futuras se focalizarán en determinar si la activación de GAPs es la responsable de la disminución en los niveles de Rac-GTP que reportamos en este trabajo.

En la curva temporal de cambio en los niveles de ARNm de TGFβ2 luego del estímulo de HRG, se observó que los mismos aumentan a partir de los 30 minutos con HRG, llegando a un pico a las 2 horas. Estos resultados, sugieren que la activación de Rac1 desencadenada por la unión de la HRG a receptores ErbB, podría inducir un aumento de TGFβ2, y este último podría contribuir al fenotipo de las células de cáncer de mama. Inicialmente hipotetizamos que TGFβ2 podría estar actuando como un inductor autocrino necesario para el aumento de la activación de Rac dependiente de HRG. Dado que el aumento de TGFβ2 es máximo cuando la activación de Rac empieza a bajar, es poco probable que el aumento en TGFβ2 sea necesario para el mantenimiento de dicha activación. Si bien no puede descartarse aun la participación de TGFβ2 sobre la activación de Rac1, los resultados obtenidos sugieren que otras hipótesis alternativas deberían ser exploradas. Por ejemplo, podría ser que el aumento de TGFβ2 no fuera necesario para el mantenimiento de la activación de Rac por HRG sino para su inactivación. También podría ser que el aumento de TGFβ2 dependiente de HRG y P-Rex1 sea necesario para eventos posteriores relacionados con la migración celular, sin la cual la migración no ocurriría. Dichas hipótesis de trabajo serán evaluadas en un futuro cercano en el laboratorio de la Dra Wertheimer. Para dar respuesta a los interrogantes planteados se llevarán a cabo ensayos de ganancia y pérdida de función con TGFβ2 recombinante y ARNi específicos para TGFβ2 o su receptor.

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y las terapias actuales a menudo no logran encontrar el foco principal que impulsa la progresión de la enfermedad. Nuestra hipótesis de trabajo es que existe una interacción entre las diferentes vías de señalización que comparten un nodo de convergencia en P-Rex1/Rac, e interactúan complementaria o sinérgicamente durante la progresión del cáncer de mama. En particular, proponemos una interacción entre las vías de TGFβ2 y HRG. La puesta a punto de las técnicas desarrolladas en este trabajo permitirán la realización de futuros ensayos, que desafiaran nuestra hipótesis. Si la misma fuera correcta, nuestra investigación serviría para guiar en la selección de terapias dirigidas aportando nuevas combinaciones de drogas para lograr mayores tasas de curación, mayor tiempo libre de relapso y una reducción significativa de los efectos secundarios no deseados, mejorando la calidad de vida y reduciendo el impacto socio-económico de esta enfermedad altamente prevalente en Argentina y Latinoamérica en general.

CONCLUSIONES

En este trabajo logramos:

- Expresar a la proteína de fusión GST-PBD en bacterias *E. Coli* BL21 y purificarla usando bolitas de glutatión sefarosa.
- Poner a punto la cantidad de GST-PBD a usarse en cada ensayo de *pull-down* de Rac activado, así como también el mejor tiempo corto para ver la activación.
- Diseñar *primers* específicos para TGFβ2 y 18S que probaron ser eficientes para ser usados en reacciones de Q-PCR.
- Probar que los niveles de ARNm de TGFβ2 aumentan en 3 veces ante un estímulo de 6 horas con HRG, validando así parte de los datos obtenidos en el *microarray* de ADNc.
- Determinar la cinética de activación de Rac con estímulos de HRG en células T-47D, con tiempos que van desde 0 a 6 horas de estimulación. De esta forma se vio que Rac1 tiene un pico de activación desde los 5 minutos que es mantenido hasta las 2 horas, y que los niveles de Rac-GTP descienden hasta alcanzar un 37% del máximo a las 6 horas.
- Comprobar que si bien la HRG agregada perdería parte de su capacidad de activar a Rac después de 6 hs a 37°C, la inactivación de Rac observada no se debe a la HRG per

se, ya que el agregado de HRG fresca no es suficiente para reestablecer la activación de Rac.

- Determinar los niveles de ARNm de TGF β 2 con estímulos de HRG de 0 a 6 horas en células T-47D. Encontrando que los niveles aumentan a partir de los 30 minutos, llegando a un pico a las 2 horas de estimulación.
- Demostrar que existe un orden secuencial entre la activación de Rac y el aumento del ARNm de TGF β 2 y establecer nuevas hipótesis de trabajo basadas en los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abidi, W.M. et al., 2007. *Nuclear localization of the Rac1 GTPase: Towards the understanding of a signaling cascade in the nucleus.* p.136.
- Ali, H.R. et al., 2014. Genome-driven integrated classification of breast cancer validated in over 7,500 samples. *Genome biology*, 15(8), p.431.
- Balasenthil, S. et al., 2004. p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem*, 279(2), pp.1422–1428..
- Barber, M.A. et al., 2007. Membrane translocation of P-Rex1 is mediated by G protein betagamma subunits and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 282(41), pp.29967–29976.
- Barrio-Real, L. et al., 2016. Characterization of a P-Rex1 gene signature in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(32).
- Baulida, J. et al., 1996. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *The Journal of biological chemistry*, 271(9), pp.5251–7.
- Benard, V., Bohl, B.P. & Bokoch, G.M., 1999. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *The Journal of biological chemistry*, 274(19), pp.13198–204.
- Benard, V. & Bokoch, G.M., 2002. Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase Activation by Affinity Methods. In pp. 349–359.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V. & Berenjano, I.M., 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, 29(4), pp.356–370.
- Cai, D. et al., 2003. AND-34/BCAR3, a GDP exchange factor whose overexpression confers antiestrogen resistance, activates Rac, PAK1, and the cyclin D1 promoter. *Cancer Res*, 63(20), pp.6802–6808.
- Citri, A., Skaria, K.B. & Yarden, Y., 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*, 284(1), pp.54–65.
- Dankort, D.L. & Muller, W.J., 2000. Signal transduction in mammary tumorigenesis: a

-
- transgenic perspective. *Oncogene*, 19(8), pp.1038–44.
- Derynck, R. & Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 425(6958), pp.577–584.
- Donald, S. et al., 2004. P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett*, 572(1–3), pp.172–176.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A., 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420(6916), pp.629–635.
- Feng, X.-H. & Derynck, R., 2005. SPECIFICITY AND VERSATILITY IN TGF- β SIGNALING THROUGH SMADS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), pp.659–693.
- Graus-porta, D. et al., 1997. ErbB-2 , the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors , is a mediator of lateral signaling. , 16(7), pp.1647–1655.
- Habets, G.G. et al., 1994. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*, 77(4), pp.537–549.
- Heldin, C.H., 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80(2), pp.213–23.
- Hill, C.S., Wynne, J. & Treisman, R., 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 81(7), pp.1159–1170.
- Holm, C. et al., 2006. Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 98(10), pp.671–680.
- Humphreys, R.C. & Hennighausen, L., 2000. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene*, 19(8), pp.1085–1091.
- Hynes, N.E. & Lane, H.A., 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5(5), pp.341–354.
- Hynes, N.E. & MacDonald, G., 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), pp.177–184.
- Jaffe, A.B. & Hall, A., 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev*

Biol, 21, pp.247–269.

- Joyce, D. et al., 1999. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*, 274(36), pp.25245–9.
- Justo, N. et al., 2013. A review of breast cancer care and outcomes in Latin America. *The oncologist*, 18(3), pp.248–56.
- Karunagaran, D. et al., 1996. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *The EMBO journal*, 15(2), pp.254–64.
- Kazanietz, M.G., 2000. Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol Carcinog*, 28(1), pp.5–11.
- Koressaar, T. & Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), pp.1289–1291.
- Liu, Y. et al., 2008. Targeted overexpression of vav3 oncogene in prostatic epithelium induces nonbacterial prostatitis and prostate cancer. *Cancer Res*, 68(15), pp.6396–6406.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), pp.402–408.
- Manser, E. et al., 1994. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, 367(6458), pp.40–46.
- Markham, N.R. & Zuker, M., 2008. UNAFold. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp. 3–31.
- Massagué, J., 1998. TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), pp.753–791.
- Mayeenuddin, L.H., McIntire, W.E. & Garrison, J.C., 2006. Differential sensitivity of P-Rex1 to isoforms of G protein betagamma dimers. *J Biol Chem*, 281(4), pp.1913–1920.
- Miki, T. et al., 1993. Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature*, 362(6419), pp.462–465.
- Montero, J.C. et al., 2011. P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer. *Oncogene*, 30(9), pp.1059–

1071.

- Petritsch, C. et al., 2000. TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes & development*, 14(24), pp.3093–101.
- Pilichowska, M. et al., 1997. Immunohistochemical study of TGF-alpha, TGF-beta1, EGFR, and IGF-1 expression in human breast carcinoma. *Mod Pathol*, 10(10), pp.969–975.
- Del Pozo, M.A. et al., 2002. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol*, 4(3), pp.232–239.
- Qin, J. et al., 2009. Upregulation of PIP3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene*, 28(16), pp.1853–1863.
- Ridley, A.J. et al., 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70(3), pp.401–410.
- Roberts, A.B. & Wakefield, L.M., 2003. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), pp.8621–3.
- Rosenfeldt, H., Vazquez-Prado, J. & Gutkind, J.S., 2004. P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor. *FEBS Lett*, 572(1–3), pp.167–171.
- Salh, B. et al., 2002. Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer. *Int J Cancer*, 98(1), pp.148–154.
- Shi, Y. & Massagué, J., 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), pp.685–700.
- Siegel, P.M. & Massagué, J., 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(11), pp.807–820.
- Slamon, D.J. et al., 1987. Correlation Amplification. *Science*.
- Sosa, M.S. et al., 2010. Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell*, 40(6), pp.877–892.
- Stove, C. & Bracke, M., 2004. Roles for neuregulins in human cancer. *Clin Exp Metastasis*, 21(8), pp.665–684.
- Svec, D. et al., 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise

-
- and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, pp.9–16.
- Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T., 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81(1), pp.153–208.
- Thiel, D.A. et al., 2002. Cell cycle-regulated phosphorylation of p21-activated kinase 1. *Curr Biol*, 12(14), pp.1227–1232.
- Thornton, B. & Basu, C., 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), pp.145–154.
- Untergasser, A. et al., 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), p.e115.
- Wang, H. et al., 2006. Phospholipase Cgamma/diacylglycerol-dependent activation of beta2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling. *Embo J*, 25(10), pp.2062–2074.
- Wang, H. & Kazanietz, M.G., 2002. Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain. *J Biol Chem*, 277(6), pp.4541–4550.
- Wang, S.C. & Hung, M.C., 2001. HER2 overexpression and cancer targeting. *Semin Oncol*, 28(5 Suppl 16), pp.115–124.
- Wang, S.E. et al., 2006. HER2/Neu (ErbB2) signaling to Rac1-Pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res*, 66(19), pp.9591–9600.
- Wang, S.E. et al., 2006. HER2/Neu (ErbB2) signaling to Rac1-Pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor β . *Cancer Research*, 66(19), pp.9591–9600.
- Waterman, H. & Yarden, Y., 2001. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Letters*, 490(3), pp.142–152.
- Welch, H.C. et al., 2002. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, 108(6), pp.809–821.
- Wells, C.M. et al., 2004. Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and

-
- membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci*, 117(Pt 7), pp.1259–1268.
- Wennerberg, K. & Der, C.J., 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*, 117(Pt 8), pp.1301–1312.
- Wertheimer, E. et al., 2012. Rac signaling in breast cancer: a tale of GEFs and GAPs. *Cellular signalling*, 24(2), pp.353–62.
- Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R., 2009. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), pp.156–172.
- Yang, C. et al., 2006. Essential Role for Rac in Heregulin 1 Mitogenic Signaling: a Mechanism That Involves Epidermal Growth Factor Receptor and Is Independent of ErbB4. *Molecular and Cellular Biology*, 26(3), pp.831–842.
- Yang, C. et al., 2006. 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(3), pp.831–842.
- Yang, C. et al., 2008. Heregulin beta1 promotes breast cancer cell proliferation through Rac/ERK-dependent induction of cyclin D1 and p21Cip1. *Biochem J*, 410(1), pp.167–175.
- Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), pp.127–137.
- Zohn, I.M. et al., 1998. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene*, 17(11), pp.1415–1438.