



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PAK1-C-ABL EN
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TANIA REYES MENDOZA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

COMITÉ TUTOR: DRA. ALIESHA GONZÁLES ARENAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México, Mayo, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PAK1-C-ABL EN
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TANIA REYES MENDOZA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

COMITÉ TUTOR: DRA. ALIESHA GONZÁLES ARENAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México, 2021.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA
OFICIO CPCB/388/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **01 de marzo de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de (**Biología Experimental**) de la estudiante **REYES MENDOZA TANIA** con número de cuenta **414050563** con la tesis titulada “**Estudio de la vía de señalización PAK1-c-ABL en cáncer de mama triple negativo**”, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

Vocal: DR. JOSÉ SULLIVÁN LÓPEZ GONZÁLEZ

Vocal: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

Secretario: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de abril de 2021

**COORDINADOR DEL
PROGRAMA**



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo en la realización del presente proyecto.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la obtención del grado, con número 737201.

Al Dr. Luis Enrique Arias Romero por darme la oportunidad y brindarme la confianza de realizar este proyecto en su laboratorio.

A mi comité tutorial Dra. Aliesha Gonzáles Arenas y Dr. Felipe Vaca Paniagua, por sus consejos y apoyo en la puesta a punto del proyecto, así como tomarse el tiempo de revisar mi tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer a mis padres y a mi hermana por ser los cimientos de mi desarrollo académico y personal, por su apoyo incondicional y la confianza que depositaron en mí para que pudiera alcanzar mis sueños, así como por todas sus enseñanzas que me permitieron llegar hasta este punto; de igual forma quiero agradecer a mi compañero de aventuras por su apoyo y comprensión ante este largo camino así como su amor y paciencia que me impulsaron a seguir adelante.

A mi tutor y director de este proyecto el Dr. Luis Enrique Arias Romero por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio y de poder desarrollar mi proyecto bajo su dirección.

Al M en C. Héctor Iván Saldívar Cerón por ayudarme a cumplir cada objetivo de este proyecto y ser mi guía en el mismo, así como por su motivación y amistad brindada en este proceso.

A mis asesores el Dr. Felipe Vaca Paniagua y la Dra. Aliesha Araceli Gonzalez Arenas, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis por sus observaciones y sugerencias que permitieron enriquecer este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que forman parte del Laboratorio 14 por su gran apoyo y dedicación que permitieron la culminación de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS

ABREVIACIONES

RESUMEN.....1

ABSTRACT.....3

1.	INTRODUCCION.....	4
1.1	CÁNCER.....	4
1.2	EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER	5
1.3	CÁNCER DE MAMA.....	6
1.4	SUBTIPOS INTRÍNSECOS DE CÁNCER DE MAMA.....	6
1.4.1	LUMINAL A	6
1.4.2	LUMINAL B	7
1.4.3	ERBB2/HER2 POSITIVO.....	7
1.4.4	TRIPLE NEGATIVO.....	8
1.5	TASA DE SOBREVIVENCIA DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	9
1.6	TASA DE REINCIDENCIA DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	10
1.7	TRATAMIENTOS CONTRA CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	11
1.7.1	TRATAMIENTOS NEOADYUVANTES Y ADYUVANTES.....	11
1.7.2	NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS.....	12
1.7.2.1	ANTAGONISTAS DE EGFR.....	12
1.7.2.2	AGENTES ANTIANGIOGÉNICOS.....	13

1.7.2.3	INHIBIDORES DE PARP.....	13
1.8	BLANCOS TERAPÉUTICOS EMERGENTES PARA EL TRATAMIENTO.....	14
1.9	FAMILIA DE PROTEÍNAS PAK.....	15
1.9.1	MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE PAKS DEL GRUPO I.....	16
1.9.2	MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE PAKS DEL GRUPO II.....	17
1.10	PROTEÍNAS PAK EN CÁNCER.....	18
1.11	PROTEÍNA C-ABL.....	20
1.11.1	ACTIVACIÓN DE C-ABL.....	21
1.12	C-ABL EN CÁNCER.....	22
2.	ANTECEDENTES.....	24
3.	HIPOTESIS.....	26
4.	OBJETIVO GENERAL.....	26
4.1	OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1	CULTIVO CELULAR.....	27
5.1.1	MDA-MB-231.....	27
5.1.2	CULTIVO PRIMARIO ECL-1.....	27
5.1.3	MCF-10A.....	27
5.2	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	27
5.3	SDS-PAGE.....	28
5.4	“WESTERN BLOT”.....	28
5.5	CO-LOCALIZACIÓN DE PAK1 Y C-ABL.....	29

5.6	NIVELES DE EXPRESIÓN DE PAK1 Y C-ABL EN TUMORES DE MAMA HUMANOS.....	30
5.7	ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	30
5.8	ENSAYO DE APOPTOSIS.....	32
5.9	ENSAYO DE MIGRACIÓN EN TRANSWELL.....	32
5.10	ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA.....	34
5.11	ENSAYO DE MIGRACIÓN ALEATORIA.....	34
5.12	ENSAYO DE INVASIÓN.....	35
5.13	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
6.	RESULTADOS.....	36
6.1	PAK1 Y C-ABL CO-LOCALIZAN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	36
6.2	ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PAK1 Y C-ABL EN TUMORES DE MAMA HUMANOS.....	38
6.3	LA INHIBICIÓN COMBINADA DE PAK1 Y C-ABL DISMINUYE LA SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.	39
6.4	LA INHIBICIÓN COMBINADA DE PAK1 Y C-ABL INDUCE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	43
6.5	LA INHIBICIÓN COMBINADA DE PAK1 Y C-ABL DISMINUYE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	45
6.5.2	ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA.....	49
6.5.3	ENSAYO DE MIGRACIÓN ALEATORIA.....	52
6.6	LA INHIBICIÓN COMBINADA DE PAK1 Y C-ABL REDUCE LA INVASIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVAS.....	54
7.	DISCUSIÓN.....	56
8.	CONCLUSIONES.....	62

9.	PERSPETIVAS.....	62
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
11.	APÉNDICE.....	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Capacidades adquiridas en el cáncer.
- Figura 2.** Epidemiología del cáncer en los Estados Unidos, 2017.
- Figura 3.** Miembros de la familia de proteínas PAK.
- Figura 4.** Mecanismos de activación de las PAK del grupo I y las PAK del grupo II.
- Figura 5.** Microarreglos de fosfoanticuerpos que muestran cambios en la actividad de las proteínas en la vía de señalización ErbB2/HER2.
- Figura 6.** Esquema de los dominios de la proteína c-ABL.
- Figura 7.** Esquema de c-ABL en su conformación activa e inactiva.
- Figura 8.** Co-localización de PAK1 y c-ABL en un contexto celular.
- Figura 9.** Expresión de PAK1 y c-ABL en muestras de tumores de mama humanos.
- Figura 10.** Análisis de supervivencia de células de cáncer de mama triple negativo en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL.
- Figura 11.** Análisis de sinergia de PAK1 y c-ABL.
- Figura 12.** Apoptosis de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y ECL-1 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL.
- Figura 13.** Migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL.
- Figura 14.** Migración de células de cáncer de mama ECL-1 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL.
- Figura 15.** Análisis de cierre de herida de células de cáncer de mama MDA-MB-231 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL.
- Figura 16.** Análisis de cierre de herida de células de cáncer de mama ECL-1 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL.
- Figura 17.** Análisis de migración aleatoria de células de cáncer de mama ECL-1 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL.
- Figura 18.** Análisis de inhibición combinada de PAK1 y c-ABL en la invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231.

ABREVIACIONES

° C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AID	Dominio de autoinhibición
ATP	Adenosin trifosfato
c-ABL	Cinasa de leucemia murina de Abelson
CK	Citoqueratina
CO2	Dióxido de carbono
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ErbB2/HER2	Receptor dos del factor de crecimiento epidérmico
ER	Receptor de estrógenos
GBD	Dominio de unión a GTPasa
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
mM	Milimol
NES	Señal de exportación nuclear
NHEJ	Unión de extremos no homologos
NSL	Señal de localización nuclear
PAK	Cinasas activadas por p-21
PARP	Poli ADP-ribosa polimerasa
PBD	Dominio de unión a p-21
PI3K	Fosfatidilinositol- 3-cinasa
PR	Receptor de progesterona
PS	Pseudosustrato
RTK	Receptor tirosina cinasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
µg	Microgramos
µL	Microlitros

RESUMEN

El cáncer de mama es un grave problema de salud pública y el cáncer más común en mujeres en el mundo, particularmente el cáncer de mama triple negativo es altamente agresivo, ya que este tipo de tumores muestran una alta actividad invasiva y actualmente carece de terapia dirigida. Por tanto, la identificación de moléculas de señalización que funcionan como dianas terapéuticas para este subtipo de cáncer de mama es de gran importancia. Las cinasas activadas por p21 (PAKs) fueron las primeras cinasas activadas por GTPasas en ser identificadas. Estas proteínas desempeñan papeles muy importantes en distintos procesos celulares, incluyendo el mantenimiento de la morfología celular, sobrevivencia, transcripción génica, progresión del ciclo celular, apoptosis, motilidad y señalización hormonal, entre otros. Es por esto que la desregulación de esta enzima se ha relacionado con diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. Recientemente, ensayos de fosfoproteómica han mostrado que varias moléculas de señalización implicadas en el inicio y/o progresión del cáncer se encuentran hipofosforiladas en células de cáncer de mama deficientes de PAK1, incluyendo algunos sustratos bien caracterizados de PAK1 y también algunas otras proteínas que podrían ser reguladas directa o indirectamente por PAK1. Una de estas moléculas es la proteína tirosina cinasa de tipo no receptora c-ABL, que potencialmente podría ser un nuevo sustrato de PAK1. En los últimos años se ha encontrado que c-ABL se encuentra sobreexpresada y constitutivamente activa en algunos tumores sólidos incluido el cáncer de mama triple negativo donde regula principalmente la remodelación del citoesqueleto de actina, importante para la migración e invasión celular. Sin embargo, el mecanismo molecular de la activación de c-ABL en estos tipos de cáncer no es completamente entendido. Es por ello que el objetivo de este estudio fue evaluar el papel que juega la interacción de estas proteínas en cáncer de mama triple negativo y determinar los procesos importantes durante la carcinogénesis y progresión tumoral en los cuales se encuentran involucradas, así como evaluar el efecto de la inhibición combinada de ambas proteínas empleando un modelo *in vitro* de cáncer de mama triple negativo. Se identificó que ambas proteínas interactúan directamente en un contexto celular y que la inhibición combinada de ambas proteínas reduce la

supervivencia, induce apoptosis y reduce la migración e invasión celular. Dado que PAK1 y c-ABL tienen una estrecha interacción en el cáncer de mama triple negativo y que la inhibición combinada de ambos reduce características celulares implicadas en la iniciación y progresión tumoral, se requiere un estudio detallado de los mecanismos a través de los cuales se produce este efecto, ya que esto permitirá evaluar su papel como posibles dianas terapéuticas.

Palabras clave: cáncer de mama, PAK1, c-ABL, procesos celulares, blanco terapéutico.

ABSTRACT

Breast cancer is a serious public health problem and the most common cancer in women in the world, particularly triple negative breast cancer is highly aggressive, since this type of tumor shows a high invasive activity and currently lacks of targeted therapy. Therefore, the identification of signaling molecules that function as therapeutic targets for this subtype of breast cancer is of great importance. P21-activated kinases (PAKs) were the first GTPase-activated kinases identified. These proteins play very important roles in different cellular processes, including the maintenance of cell morphology, survival, gene transcription, cell cycle progression, apoptosis, motility and hormonal signaling, among others. This is why dysregulation of this enzyme has been linked to various diseases, including cancer. Recently, phosphoproteomics assays have shown that several signaling molecules involved in cancer initiation and / or progression are hypophosphorylated in PAK1-deficient breast cancer cells, including some well-characterized substrates of PAK1 and also some other proteins that could be regulated directly or indirectly by PAK1. One of these molecules is the non-receptor protein tyrosine kinase c-ABL, which could potentially be a new substrate for PAK1. In recent years, it has been found that c- ABL is overexpressed and constitutively active in some solid tumors, including triple negative breast cancer, where it mainly regulates the remodeling of the actin cytoskeleton, important for cell migration and invasion. However, the molecular mechanism involved in the activation of c-ABL in these types of cancer is not fully understood. That is why the objective of this study was to evaluate the role of the interaction of these proteins in triple negative breast cancer and to determine the important processes during carcinogenesis and tumor progression in which they are involved, as well as to evaluate the effect of the combined inhibition of both proteins using an *in vitro* model of triple negative breast cancer. It was identified that both proteins interact directly in a cellular context and that the combined inhibition of both proteins reduced survival, induced apoptosis and reduced cell migration and invasion. Since PAK1 and c-ABL have an interaction in triple negative breast cancer and that the combined inhibition of both reduce cellular characteristics involved in tumor initiation and progression, a detailed study of the mechanisms through which this effect will occur is necessary, since this will allow to evaluate their role as possible therapeutic targets.

Keywords: Breast cancer, PAK1, c-ABL, cellular processes, therapeutic target.

1. INTRODUCCION

1.1 CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que ocurren cambios dinámicos en el genoma [1], y es el resultado de diversas causas ambientales que contribuyen a la adquisición de mutaciones que conducen a la activación de oncogenes y a la inactivación de supresores tumorales, es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier parte del cuerpo [2], lo cual da como resultado la formación de tumores malignos [3].

Recientemente se ha sugerido que la mayoría de los tumores humanos comparten un pequeño número de rasgos moleculares, bioquímicos y celulares denominados capacidades adquiridas (Fig.1), los cuales conducen a la transformación progresiva de células normales en derivados altamente malignos, estas características en conjunto nos proporcionan un marco para la comprensión de la compleja biología del cáncer [4].



Figura 1. Capacidades adquiridas en el cáncer. Se observan las características adquiridas propuestas inicialmente y la actualización de las mismas las cuales están involucradas en el proceso de transformación celular, cada una con un mecanismo que conduce a la formación del fenotipo maligno. Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

Se estima que más de 600,000 estadounidenses morirán de cáncer en 2017, lo que equivale a 1,650 muertes por día. Los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad son pulmón y bronquios, colon y recto y próstata en hombres, y pulmón y bronquios, mama y colon y recto en mujeres (Fig. 2). Estos cuatro cánceres representan aproximadamente el 50% de todas las muertes por cáncer [5].

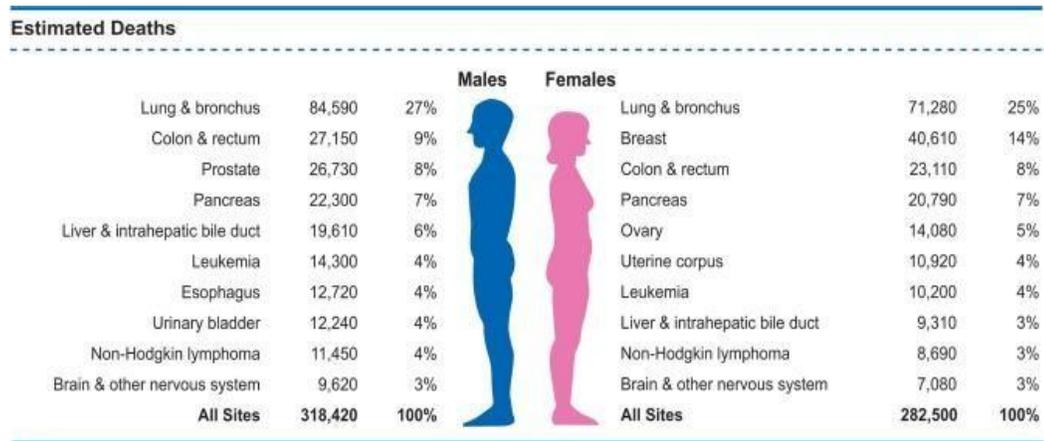


Figura 2. Epidemiología del cáncer en los Estados Unidos, 2017. (Tomado de, Siegel, 2017).

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte por neoplasias en el sexo femenino, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se calcula que a nivel mundial una mujer muere cada 13 minutos debido a este padecimiento [6,7], es el tipo de cáncer más común entre las mujeres en el mundo, que representa alrededor del 16% de todos los diagnósticos de cáncer en la población femenina [8].

En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte entre las mujeres de 30 a 45 años y afecta a mujeres de todos los niveles socioeconómicos, [9]. Durante 2008, la tasa de mortalidad por cáncer de mama fue de 4,5 por 100.000 mujeres de 25 a 44 años [10], seguida de los cánceres de cuello uterino (3,8) y de estómago (2,4) [11].

1.3 CÁNCER DE MAMA

Clínicamente el cáncer se puede clasificar tomando en cuenta: el tamaño del tumor, la infiltración a nodos linfáticos y la presencia de metástasis; cada uno de estos puntos permite proyectar el comportamiento clínico de las neoplasias malignas y de esta manera establecer terapias apropiadas [12]; sin embargo, el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea tanto a nivel morfológico como molecular, por lo cual esta clasificación no es completamente útil. Por ello se han establecido nuevas clasificaciones, basadas en el análisis del perfil molecular de los cánceres de mama [13].

En 2000, Perou y sus colegas publicaron el primer artículo que clasifica el cáncer de mama en subtipos intrínsecos según los perfiles de expresión génica y fue el primero en proporcionar una clasificación molecular para el cáncer de mama [13]. Utilizando microarreglos aplicados a 38 casos de cáncer de mama el grupo determinó una lista de genes intrínsecos [14]. Los resultados de estos análisis permitieron agrupar cuatro subtipos moleculares: luminal, ErbB2 / HER2+ y triple negativo. Posteriormente, los autores ampliaron el estudio utilizando una cohorte mayor, mostrando que el subtipo luminal podría dividirse en 2 grupos (luminal A y B), que tenían diferentes pronósticos clínicos. Esta clasificación fue validada posteriormente por grupos independientes, estableciendo que este análisis permitió agrupar los tumores según sus características biológicas independientemente de sus variables clínicas o de pronóstico [13, 15].

1.4 SUBTIPOS INTRÍNSECOS DE CÁNCER DE MAMA

1.4.1 LUMINAL A

Es el subtipo más común de cáncer de mama, que representa aproximadamente el 50% de todos los casos, se caracteriza por la expresión de genes activados por el receptor de estrógenos (ER), que normalmente se expresa en el epitelio de la glándula mamaria, y una reducción de la expresión de genes asociados con la proliferación celular [13]. A nivel inmunohistoquímico este subtipo presenta la expresión de ER, el receptor a progesterona (PR), Bcl-2 y citoqueratinas (CK) 8 y

18, y por la falta de expresión del receptor 2 al factor de crecimiento epidérmico (ErbB2 / HER2) y Ki67. Los pacientes con este subtipo de tumores suelen presentar un buen pronóstico y una tasa y tiempo de reincidencia significativamente menor en comparación con otros subtipos de 28% y 2.2 años respectivamente [16]. Los tratamientos dirigidos hacia este subtipo se basan principalmente en la terapia hormonal [16], este subtipo tumoral es susceptible al tratamiento con reguladores selectivos del receptor a estrógenos, como el tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa y reguladores selectivos de ER como fulvestrant [17].

1.4.2 LUMINAL B

Este subtipo comprende alrededor del 20% de los tumores de mama y tiene un fenotipo más agresivo que el luminal A, pues presentan mayores niveles de expresión de genes relacionados a la proliferación celular y un peor pronóstico [18]. La supervivencia desde el momento de una recaída es de 1,6 años en comparación con los 2,2 de la luminal A [19]. La principal diferencia biológica entre estos dos subtipos, es que los tumores luminal B muestran una mayor expresión de genes relacionados con la proliferación como Ki67 y ciclina B1, además de expresar a menudo el receptor 2 a factor de crecimiento epidérmico (ErbB2 / HER2) [15]. Este tipo de tumores tienen peor pronóstico pues son insensibles a las terapias hormonales como el tamoxifeno y los inhibidores de aromatasa, a diferencia de los luminales A, sin embargo, responden a la quimioterapia neoadyuvante [20].

1.4.3 ERBB2/HER2 POSITIVO

Representa del 15 al 20% de los tumores de mama, estos tumores son muy agresivos y se caracterizan por una alta expresión del gen *HER2*. Este gen está ubicado en el cromosoma 17q19, es un protooncogén que codifica una glicoproteína con actividad de tirosina cinasa que pertenecen a la familia del factor de crecimiento epidermal y es muy importante para el crecimiento y la división celular [21], de igual forma se presenta la sobreexpresión de otros genes asociados con ErbB2/HER2 y la co-amplificación de al menos 14

genes ubicados en el amplicón ErbB2/HER2 [22]. Morfológicamente este subtipo es altamente proliferativo y más del 40% de estos tumores presenta mutación en *p53*, además de la sobreexpresión de ErbB2/HER2 se caracteriza por la pérdida de expresión del receptor a estrógenos (ER) y a progesterona (PR) [23.24].

Clínicamente este subtipo tiene mal pronóstico. Sin embargo, en los últimos diez años el tratamiento con terapias dirigidas anti-ErbB2 / HER2 como es el caso del anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab ha mejorado significativamente la supervivencia no solo de los pacientes con metástasis sino también en las primeras etapas [25.26].

1.4.4 TRIPLE NEGATIVO

Este subtipo representa del 10% al 20% del total de los tumores de mama, este subtipo se nombró así debido a que presenta genes que se expresan exclusivamente en células mamarias normales, incluidas las citoqueratinas de alto peso molecular como CK5 y CK17, P-cadherina, caveolina 1 y 2 [13]. Clínicamente estos subtipos de tumores presentan alta tasa mitótica, presencia de necrosis tumoral y un patrón de crecimiento agresivo con elevadas recaídas metastásicas, principalmente en pulmón, sistema nervioso central y ganglios linfáticos [28, 29]. Este subtipo se considera el más agresivo y de gran importancia clínica pues carece de la expresión de los tres receptores diana: ER, PR y ErbB2 / HER2 además de que aparece a muy temprana edad y tiene una alta tasa de recaídas en los primeros 3 años [30]. Por tanto, es fundamental identificar nuevas dianas terapéuticas y tratamientos personalizados.

1.5 TASA DE SOBREVIVENCIA DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

El cáncer de mama triple negativo se considera el subtipo de cáncer de mama más agresivo debido a su rápido crecimiento por lo que es muy probable que al momento de su detección se haya diseminado, de igual forma es muy probable que regrese después del tratamiento a diferencia de otros subtipos de cáncer de mama donde la reincidencia generalmente es menor [31]. El estadio del cáncer de mama y el grado del tumor influirán en su pronóstico, sin embargo, las tasas de sobrevivencia pueden proporcionar una idea del porcentaje de personas con el mismo tipo y estado de cáncer que todavía están vivas en una cierta cantidad de tiempo (generalmente 5 años) después de haber sido diagnosticadas. De acuerdo con el National Cancer Institute (NCI) la tasa de sobrevivencia relativa a 5 años para norteamericanas con cáncer de mama triple negativo, se encuentra agrupada en 3 etapas de cáncer: localizado, regional y distante; en el localizado no hay signos de que el cáncer se haya diseminado fuera de la mama, en el regional se agrupan aquellos tumores que se han diseminado fuera de la mama a estructuras o ganglios linfáticos cercanos y el distante corresponde a aquellos cánceres que se hayan diseminado a partes distantes del cuerpo como pulmones, hígado o hueso [32]. Con base a esta agrupación se puede determinar de forma más certera la sobrevivencia de cada paciente, sin embargo, en general las tasas de sobrevivencia a cinco años tienden a ser más bajas para el cáncer de mama triple negativo que para otras formas de cáncer de mama, según la American Cancer Society (ACS) la tasa de sobrevivencia a cinco años de pacientes con este tipo de cáncer de mama es del 77% [33].

1.6 TASA DE REINCIDENCIA DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

El cáncer de mama triple negativo además de presentar el peor pronóstico respecto a los otros subtipos, también presenta índices de reincidencia mayores. Un estudio reciente que evaluó el pronóstico en más de 1500 mujeres ilustró una mayor probabilidad de recurrencia a distancia (índice de riesgo [HR] = 2.6, $p < 0.0001$) y muerte (HR = 3.2, $p < 0.0001$) entre las mujeres con cáncer de mama triple negativo en comparación con la enfermedad no triple negativa, por otro lado, el patrón de recurrencia durante un período de seguimiento de 5 años fue sustancialmente diferente entre los grupos pues las mujeres con cáncer de mama triple negativo eran mucho más propensas a desarrollar una recurrencia durante los primeros 3 años después de la terapia con descensos rápidos posteriores [34].

Por otra parte, la metástasis a hueso es común entre los diagnosticados con enfermedad triple negativa frente a ER positiva [35]. En un estudio de 344 pacientes con tumores de mama con ganglios linfáticos negativos tratados únicamente con terapia local, se aplicó la lista de genes intrínsecos para clasificar los subtipos moleculares (es decir, luminal, triple negativo, ErBb2/HER2 positivo, etc.), de modo que los patrones de recaída específicos del sitio podrían ser determinados, se observó que la metástasis a hueso era más probable que ocurriera en los subtipos triple negativos, pero menos probable en los subtipos luminales. La metástasis pulmonar se observó con mayor frecuencia en el subtipo triple negativo y menos probable entre los subtipos luminales [36], lo que indica una mayor predisposición de reincidencia y metástasis entre los pacientes diagnosticados con cáncer de mama triple negativo.

1.7 TRATAMIENTOS CONTRA CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

En la actualidad, el subtipo de cáncer de mama triple negativo carece de terapia dirigida a diferencia de los otros subtipos moleculares, lo que intensifica la necesidad y el interés de promover nuevas estrategias terapéuticas más allá de la quimioterapia para este subconjunto de pacientes de alto riesgo.

1.7.1 TRATAMIENTOS NEOADYUVANTES Y ADYUVANTES

Hay varias características inherentes a los cánceres de tipo triple negativo que se ha demostrado consistentemente que están asociadas con la respuesta clínica y patológica a la quimioterapia neoadyuvante en general; concretamente la ausencia de expresión de ER y alta expresión de Ki-67 [37].

El cáncer de mama triple negativo es sensible a la quimioterapia (principalmente antraciclinas solas o en combinación con taxanos) y en el contexto neoadyuvante, los tumores triple negativos tienen una mayor tasa de respuesta, que, a su vez, se correlaciona con un mejor resultado [38], sin embargo en pacientes con este tipo de terapias el riesgo de recurrencia en los primeros tres años es mayor en comparación con pacientes con otro subtipo de cáncer de mama y el tiempo medio de supervivencia desde la recurrencia hasta la muerte es significativamente más corto [39]. Bajo esta premisa es importante señalar que el cáncer de mama triple negativo es quimio-sensible, pero por mecanismos aún desconocidos escapa al control del tratamiento convencional, la recaída es más agresiva y disminuye la tasa de supervivencia.

Estudios preclínicos y clínicos indican que los tumores Breast cáncer (BRCA) negativos son deficientes en los mecanismos de reparación del daño al ADN por recombinación homóloga y por lo tanto son sensibles a los agentes alquilantes como las sales de platino (cisplatino y carboplatino) [40]. Las consecuencias de la mutación en Breast cáncer 1 (BRCA1) han llevado a varios estudios con neoadyuvantes que ilustran efectividad de los regímenes basados en platino en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo [34].

Por otro lado, la gran mayoría de los pacientes con tumores triple negativos se benefician de la quimioterapia adyuvante, generalmente al igual que en la terapia neoadyuvante los regímenes basados en antraciclinas y taxanos son considerados la estrategia óptima [41]. En este tipo de tratamientos la quimioterapia con dosis frecuente es de gran interés, pues se ha observado que la eficacia puede mejorar cuando se aumenta la intensidad del tratamiento dando al individuo medicamentos secuencialmente en dosis altas en lugar de dar dosis bajas al mismo tiempo, o acortando los intervalos entre ciclos [42].

1.7.2 NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Actualmente los esfuerzos científicos destinados a estudiar la biología del cáncer de mama triple negativo han revelado estrategias específicas prometedoras que incluyen agentes dirigidos al receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), antiangiogénicos, inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) y algunas moléculas de señalización claves en el inicio y la progresión tumoral.

1.7.2.1 ANTAGONISTAS DE EGFR

La expresión de EGFR se observa en aproximadamente el 45-70% de los tumores de mama triple negativos, por esta razón, la inhibición de este receptor se ha utilizado como enfoque terapéutico [43]. Cetuximab, un anticuerpo monoclonal quimérico contra EGFR, está siendo probado en el entorno de tumores de mama triple negativo metastásico, sin embargo, en estudios clínicos Cetuximab tiene una tasa de respuesta baja como agente único y solamente en combinación con cisplatino hubo un ligero aumento en la tasa de respuesta, por lo que actualmente se desea evaluar la eficacia de este anticuerpo en combinación con algún otro agente terapéutico [27].

1.7.2.2 AGENTES ANTIANGIOGÉNICOS

La angiogénesis es un mecanismo fundamental en el crecimiento tumoral, por lo que el desarrollo de fármacos dirigidos hacia los mecanismos celulares implicados en la neoangiogénesis es una de las prioridades de investigación actual. Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [44]. Desde el 2008 la FDA aprobó el uso de bevacizumab en combinación con el agente quimioterapéutico paclitaxel ya que esta combinación aumenta la supervivencia libre de progresión, sin embargo, no en todos los casos esta terapia resulta totalmente eficiente por lo que la adición de bevacizumab u otros antiangiogénicos a la quimioterapia aún se está explorando [45].

1.7.2.3 INHIBIDORES DE PARP

PARP1 es un sensor que señala la presencia de daño en el ADN y facilita la reparación del ADN mediante reparación por escisión de la base [46]. La inhibición de PARP1 durante la fase S del ciclo celular induce rupturas de una sola hebra del ADN lo cual conduce a la detención de la horquilla de replicación que a su vez da como resultado rupturas de la doble cadena de ADN, estas lesiones normalmente se repararían, pero en ausencia de PARP este mecanismo se ve afectado y los defectos pueden repararse mediante otros métodos muy propensos a errores como la unión de extremos no homólogos (NHEJ), o simplemente no repararse lo cual conduce a la detención del ciclo celular en el punto de control G2/M conduciendo a la apoptosis [47].

Los datos obtenidos de los estudios preclínicos y clínicos indican que los inhibidores de PARP tienen efectos antitumorales cuando uno de los mecanismos de desarrollo de tumores es una reparación defectuosa del ADN. Además, los inhibidores de PARP parecen mejorar la respuesta al tratamiento cuando se asocian con agentes quimioterapéuticos clásicos [48].

1.8 BLANCOS TERAPÉUTICOS EMERGENTES PARA EL TRATAMIENTO

Las señales proliferativas independientemente de su naturaleza activan receptores que desencadenan cascadas de señalización intracelular las cuales culminarán en la modificación de expresión génica [49]. Las proteínas cinasas son las principales reguladoras de diversas cascadas de señalización intracelular ya que al fosforilar a proteínas diana controlan su actividad, interacciones con otras moléculas, ubicación celular, resistencia a la degradación entre muchos otros procesos celulares; muchos componentes de estas vías proliferativas se encuentran sobreexpresados o mutados en células cancerosas por lo que son potenciales blancos de intervención terapéutica [49].

Las principales cascadas de señalización de proteínas cinasas en el desarrollo del fenotipo maligno son las vías de fosfoinositido 3-OH cinasa (PI3K) cuyos elementos río abajo incluyen Akt y la proteína diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), así como la vía clásica de las proteínas cinasa activadas por mitógenos o MAPK (vía de Ras/RAF/MEK/ERK), la activación de esta vía de señalización conduce a la estimulación posterior de una serie de factores incluido el factor de transcripción c-MYC [50], a su vez estas dos vías de señalización se entrecruzan en varios puntos regulando procesos celulares como proliferación, migración, progresión del ciclo celular y sobrevivencia. Es por ello que muchos componentes de estas vías de señalización están siendo actualmente evaluadas como posibles blancos terapéuticos en el tratamiento de cáncer de mama, las investigaciones actuales se centran principalmente en el subtipo triple negativo ya que no existe una terapia dirigida y eficiente contra este subtipo de cáncer.

La señalización a través de estas dos vías puede verse influenciada por las cinasas activadas por p21 (PAK) del Grupo I, una familia de efectores de las GTPasas pequeñas de la familia de Rho: Rac1 y Cdc42. En los últimos años, estas cinasas han sido reconocidas como dianas plausibles para la terapia del cáncer debido a su papel como impulsoras de muchos de los procesos celulares importantes en el inicio y progresión del cáncer [51]. De especial importancia la proteína PAK1 contribuye en gran medida a la transformación del epitelio

mamario, por lo cual es muy importante conocer los mecanismos a través de los cuales contribuye a esta transformación y evaluar si PAK1 es relevante en los diversos procesos celulares que se alteran durante el inicio y la progresión del tumor (es decir, aumento de la migración y proliferación o inhibición de la apoptosis).

1.9 FAMILIA DE PROTEÍNAS PAK

Las cinasas PAK fueron las primeras en ser activadas por GTPasas pequeñas de la familia de Rho en ser identificadas [52]. Estas proteínas desempeñan funciones importantes en una gran cantidad de procesos celulares, como la supervivencia, transcripción de genes, progresión del ciclo celular, motilidad y apoptosis, entre otros; y son activadas por GTPasas pequeñas de la familia Rho como Rac y Cdc42 [53]. Es por ello que la actividad aberrante de estas cinasas está relacionada con diversas enfermedades entre ellas el cáncer [54]. La familia de proteínas cinasas PAK está constituida por seis miembros los cuales se encuentran clasificados en dos grupos dependiendo de la homología en su secuencia, y sus características bioquímicas y estructurales, el grupo I comprende a PAK1, PAK2 y PAK3, mientras que el grupo II comprende a PAK4, PAK5 y PAK6 (Fig. 3) [55,56].

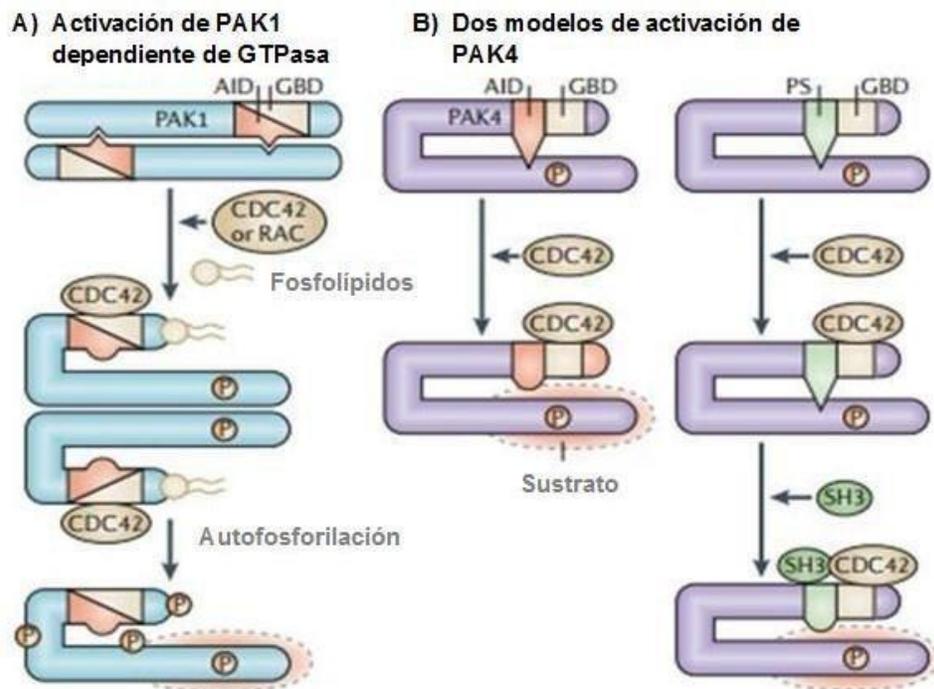


Figura 4. Mecanismos de activación de las PAK del grupo I y las PAK del grupo II. Las PAKs del grupo I se regulan por un mecanismo de auto inhibición, en el cual el dominio de unión a GTPasa (GBD) se une al dominio de auto inhibición (AID) formando un homodímero inactivo. En el caso del grupo II el dominio de cinasa se encuentra constitutivamente fosforilado por lo cual su activación en este caso depende de cambios conformacionales. (Modificado de Radu et al., 2014).

1.9.2 MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE PAKS DEL GRUPO II

A diferencia de las PAK del Grupo I, las PAK del Grupo II son cinasas monoméricas, que carecen de los motivos PXXP y hasta hace poco se pensaba que estas cinasas se encontraban constitutivamente activas ya que carecen de dominio AID, y que el dominio de GDB o PDB únicamente era importante para determinar su localización subcelular [52, 53, 55], sin embargo, informes recientes han demostrado que PAK4 posee un AID en el extremo N-terminal que inactiva su dominio catalítico en cis hasta que Cdc42 se une al dominio PDB y permite la activación [58]. Un modelo de activación alternativo propone que PAK4 se inhibe por la interacción de su dominio catalítico con una secuencia de pseudosustrato (PS) ubicada en el extremo N-terminal de PAK4. En este modelo, la unión de proteínas que contienen el dominio SH3

al PS desestabiliza dicha interacción y promueve la liberación del dominio catalítico que activa la cinasa. Se cree que PAK5 y PAK6 también siguen este modelo de activación (Fig.4B) [59].

1.10 PROTEÍNAS PAK EN CÁNCER

Actualmente diversos estudios demuestran que la activación y función aberrante de las proteínas PAK en cáncer, lo cual se relaciona con una baja sobrevivencia de pacientes, pues estas proteínas participan en la regulación de vías de señalización de proliferación, procesos morfogénicos que controlan la polaridad celular y la organización del citoesqueleto de actina, entre muchos otros procesos importantes durante el inicio y la progresión de la transformación celular [55, 60].

En cáncer de mama la proteína PAK1 se encuentra sobreexpresada en aproximadamente el 30% de los casos debido a la amplificación de su locus genético ubicado en el cromosoma 11q13 y esta amplificación se asocia con un mal pronóstico [55]. Al igual que PAK1, PAK4 también presenta amplificación de su locus genético ubicado en el cromosoma 19q13 [61, 62], sin embargo, las proteínas PAK también pueden ser hiperactivas por otros mecanismos como mutaciones activadoras en sus genes o mutaciones en sus activadores rio arriba, tal es el caso de PAK5 y PAK6 [63].

PAK1 es importante para la regulación de vías de señalización involucradas en la carcinogénesis, tal es el caso de Ras/RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR y Wnt, que controlan la progresión del ciclo celular, la supervivencia, la diferenciación y la proliferación celular [64]. En el caso de MAPK, PAK1 fosforila a c-RAF en la Ser388 y a MEK1 en la Ser298, desencadenando la activación de ERK, lo que promueve la expresión de ciclina D1 [65]. Por otro lado, PAK1 no solo funge como cinasa en la regulación de estas vías, sino que también puede funcionar como proteína de andamiaje pues la sobreexpresión de una forma

inactiva de PAK1 tiene la capacidad de activar a c-RAF demostrando que funciona como proteína de andamiaje que facilita la interacción de c-RAF con MEK, lo que indica que las funciones de andamio de la proteína contribuyen de igual medida aunque por otra vía a la transducción de señales proliferativas [65]. Lo anteriormente mencionado demuestra que PAK1 contribuye a la activación de la vía MAPK no solo de manera cinasa dependiente sino también cinasa independiente. De igual forma, PAK1 puede funcionar como proteína de andamiaje en la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR permitiendo la formación del complejo PAK1/PKPK1 (proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositido), lo cual promueve el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática para su activación [66].

La proteína PAK1 ha surgido como punto clave en el desarrollo de cáncer de mama debido a que su amplificación en tumores mamarios se asocia con un mal pronóstico y resistencia a terapias como el tamoxifeno, además el silenciamiento de PAK1 da como resultado la restauración de la arquitectura acinar normal de la glándula mamaria, lo cual no ocurre con el silenciamiento de PAK2, por lo que se sugiere que la señalización de PAK1 pero no la de PAK2 juega un papel importante en la transformación celular., Sin embargo, la transformación mediada por PAK1 no es mediada por las vías de ERK y Akt como si sucede en otros tumores y probablemente estos procesos de transformación están siendo regulados por otros efectores río abajo de PAK1 [67]. Estos hallazgos motivaron la realización de ensayos de fosfoproteómica que revelaron que varias moléculas de señalización implicadas en el inicio y/o progresión del cáncer se encuentran hipofosforiladas en células de cáncer de mama deficientes de PAK1, incluyendo algunos sustratos bien caracterizados de PAK1 y también algunas otras proteínas que podrían ser reguladas directa o indirectamente por PAK1 [67]. Una de estas moléculas es la proteína tirosina cinasa de tipo no receptora c-ABL que potencialmente podría ser un nuevo sustrato de PAK1 (Fig.5) [68,69].

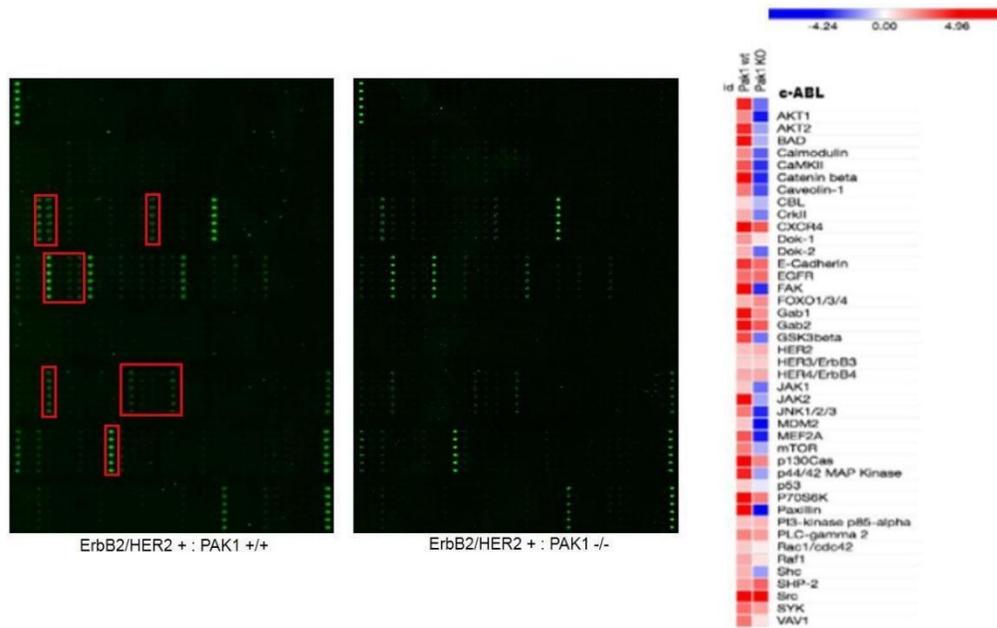


Figura 5. Microarreglos de fosfoanticuerpos que muestran cambios en la actividad de las proteínas en la vía de señalización ErbB2/HER2. Los recuadros rojos muestran las proteínas que perdieron fosforilación en ausencia de PAK1, en el grafico se nombran estas proteínas entre las cuales se encuentra c-ABL. (Editado de, Arias, 2010).

1.11 PROTEÍNA C-ABL

La proteína c-ABL es una tirosina cinasa de tipo no receptora que está localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula y está implicada en la regulación de procesos celulares durante el desarrollo y la homeostasis normal como son el crecimiento celular, sobrevivencia y morfogénesis [70]. Puede ser activada por estímulos múltiples que conducen a la reorganización del citoesqueleto necesaria para la morfogénesis celular, motilidad, adhesión y polaridad; dependiendo del contexto celular estas proteínas regulan la sobrevivencia y proliferación celular [70], por ello sus funciones frecuentemente se ven alteradas en procesos de inflamación, cáncer y otras patologías [71].

Las proteínas c-ABL muestran una organización similar a la de los miembros de la familia Src que se caracteriza por una región reguladora y catalítica N-terminal única que incluyen dominios de homología a Src (denominados SH2 y SH3) y un

dominio catalítico con actividad de tirosina cinasa o SH1 [68], en el extremo C-terminal se encuentra un dominio de unión a actina filamentosa (F) bien conservado y en seguida del dominio F posee un dominio de unión a actina globular (G) [72], además poseen motivos ricos en poli prolina (PXXP) conservados que median su interacción con otras moléculas de señalización; de acuerdo a su localización nuclear y citoplasmática las proteínas c-ABL tienen tres motivos de señal de localización nuclear (NLS) y una señal de exportación nuclear (NES) en su extremo C-terminal (Fig.6) [73].

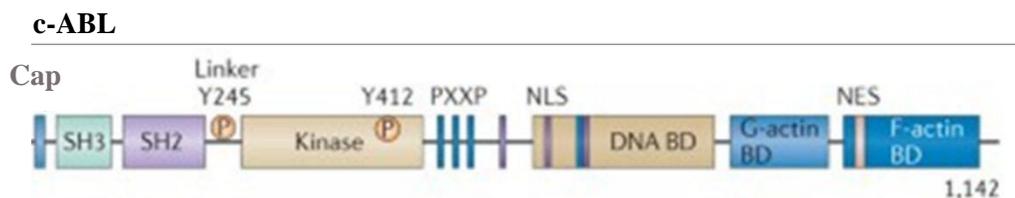


Figura 6. Representación esquemática de los dominios modulares de la proteína c-ABL. Los extremos N de c-ABL están compuestos por los dominios de homología 3 (SH3), SH2 y SH1 (tirosina cinasa). Los terminales carboxilo c-ABL contienen un dominio de unión a actina filamentosa (F), un dominio de unión a actina globular (G), tres motivos de señal de localización nuclear (NLS) y una señal de exportación nuclear (NES) en su terminal C, así como motivos PXXP para mediar en las interacciones proteína-proteína. (Editado de, Greuber, 2013).

1.11.1 ACTIVACIÓN DE C-ABL

Las actividades catalíticas de la proteína cinasa c-ABL está estrechamente regulada por interacciones intra e intermoleculares y algunas modificaciones postraduccionales [68]. Entre las interacciones intramoleculares necesarias para la autoinhibición son las que involucran a los dominios SH3 y SH2, la interacción entre el dominio SH3 y la secuencia rica en prolina presente en el dominio SH2 facilita la posterior interacción con el dominio SH1 formando una estructura de abrazadera SH3-SH2-SH1 que mantiene el dominio cinasa en una conformación inactiva [74]. Por otro lado, las modificaciones postraduccionales que regulan la activación de c-ABL incluyen fosforilaciones principalmente, un análisis fosfoproteómico identificó al menos 12 residuos de tirosina que pueden ser fosforilados por diferentes cinasas, todos estos ubicados en el extremo N-terminal [75]. Entre

los residuos de tirosina fosforilados en c-ABL se encuentran Y412 en el bucle de activación e Y245 en el enlazador de dominio de cinasa SH2. La fosforilación de estas tirosinas estabiliza la conformación activa de la cinasa c-ABL, y puede ocurrir por transfosforilación entre proteínas c-ABL o puede ser mediada por otras cinasas [76]. La estabilidad de las cinasas c-ABL puede modularse mediante fosforilación de tirosina. La fosforilación de c-ABL en Y245 e Y412 disminuye la estabilidad de la proteína mediante ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma [77].

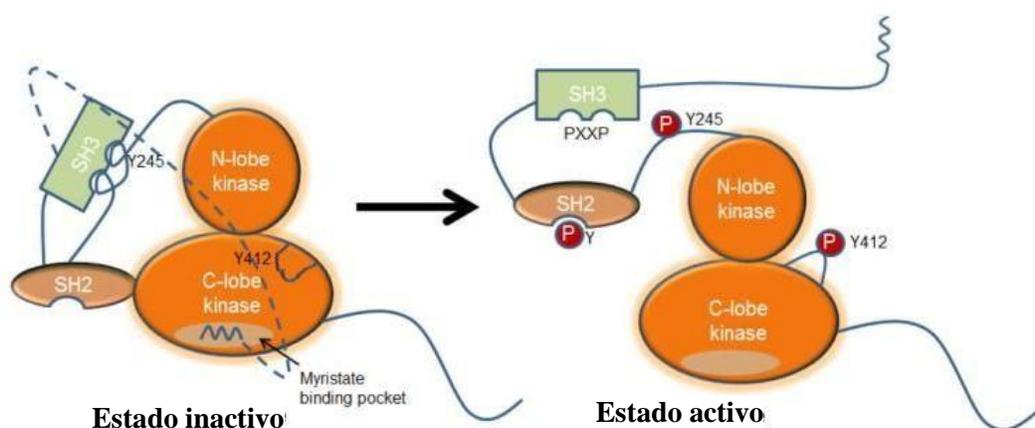


Figura 7. Representación esquemática de c-ABL en su conformación activa e inactiva. Se muestran las interacciones intramoleculares y modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de la cinasa c-ABL. (Editado de, Greuber,2013).

1.12 C-ABL EN CÁNCER

Estudios recientes han implicado a la proteína cinasa c-ABL en el desarrollo de cáncer en humanos y su actividad se ve frecuentemente afectada en leucemias, lo que conducen a la transformación celular y a la progresión del cáncer [78].

Las formas oncogénicas de c-ABL se han identificado en algunas formas de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) y leucemia mieloide aguda (LMA), en este tipo de tumores la hiperactividad de c-ABL se da por fusiones con genes tales como BCR, NUP214, EML1, ETV6 [79]. En general, las distintas fusiones se unen al dominio N- terminal de c-ABL promoviendo las actividades de transformación mediante la disrupción inhibitoria de interacciones intramoleculares,

proporcionando secuencias que facilitan la oligomerización y potencian la activación y/o reclutando cinasas quiméricas a sitios subcelulares y complejos proteicos distintos [68].

La actividad de c-ABL es aberrante en tumores sólidos como el de mama. No obstante, en estos tumores dicha hiperactividad no está relacionada con la fusión de c-ABL a ningún otro gen [70], en este caso la activación de c-ABL se ha relacionado con la estimulación de receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK) [69].

La inhibición de la proteína c-ABL con inhibidores competitivos de ATP clínicamente probados como Imatinib en distintos tipos de leucemia resulta benéfico para detener la progresión tumoral, e incluso se ha encontrado un éxito similar para el tratamiento de tumores sólidos como el de mama [68]. Además, el tratamiento de las células del cáncer de mama con Imatinib las sensibiliza a medicamentos como 5-fluorouracilo, cisplatino y vinorelbina [80], sin embargo, se necesitan estudios más profundos para definir cómo la inhibición de c-ABL sensibiliza a estas células a la quimioterapia y si tal enfoque puede mejorar la eficacia de quimioterapia in vivo.

En los últimos años varios grupos de investigación se han centrado en el estudio del cáncer de mama particularmente en la identificación de elementos de señalización que podrían servir como base de nuevas terapias, sin embargo, el cumplimiento de dicho objetivo aun es un poco lejano, por lo cual la identificación de moléculas que potencialmente podrían ser nuevos objetivos terapéuticos como es el caso de c-ABL puede resultar un gran avance en esta línea de investigación.

2. ANTECEDENTES

Hallazgos recientes de nuestro grupo de investigación establecen claramente a PAK1 como un objetivo clave para el cáncer de mama por las siguientes razones: PAK1 se encuentra amplificado y/o sobreexpresado con frecuencia en tumores mamarios y su presencia se asocia con resistencia a terapias como el tamoxifeno, esto último en tumores del subtipo luminal en donde fosforila directamente al receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) en la posición de Ser305, lo que lleva a su activación independiente de ligando. De igual manera el aumento de la expresión de PAK1 en células de cáncer de mama estimula la expresión de ciclina D1, un gen diana de estrógenos a través de esta fosforilación [81].

Por otro lado, la expresión transgénica de una mutante de PAK1 constitutivamente activa bajo un promotor específico de la glándula mamaria, induce la formación de tumores mamarios con niveles aumentados de actividad de MAPK y p38 [82].

En un modelo de cultivo 3D de células epiteliales mamarias que expresan transgénicamente el receptor ErbB2/HER2, el silenciamiento de PAK1 regula negativamente la señalización de ERK y Akt, lo que da como resultado la restauración de la arquitectura acinar normal. Sin embargo, el silenciamiento del gen PAK2 el cual también se expresa en células epiteliales de la glándula mamaria no logró restaurar la morfología acinar normal, aunque también comprometió la activación de ERK y Akt. Estos resultados sugirieron que la señalización de PAK1, pero no de PAK2, juega un papel importante en la transformación impulsada por ErbB2/HER2, además, este fenómeno no implica las vías ERK y Akt [67].

Paralelamente se observó que PAK1 fosforila a β -catenina en los residuos de Ser663 y Ser675, y que estos eventos de fosforilación estabilizan a β -catenina promoviendo su relocalización en el núcleo y la transcripción de genes de la vía de Wnt como c-Myc y Ciclina D1 [83]. Sorprendentemente, la eliminación de PAK2 no tiene ningún efecto sobre los niveles de expresión de β -catenina o su fosforilación en las células epiteliales de mama. Lo que sugiere que un eje ErbB2/HER2-PAK1- β -catenina es esencial para la transformación de las células epiteliales mamarias [67, 84].

Posteriormente, a partir de estas observaciones se realizaron análisis de fosfoproteómica en donde Arias et al. demostraron que en las células de cáncer de mama deficientes en PAK1, una gran cantidad de proteínas perdieron su fosforilación, una de estas moléculas es la proteína cinasa c-ABL, lo que sugería que podría ser un nuevo sustrato de PAK1 [67].

En mi tesis de licenciatura logré determinar que las onco-proteínas c-ABL y PAK1 se encuentran sobreexpresadas en células de cáncer de mama triple negativo y además se observó que c-ABL es fosforilada *in vitro* por PAK1 en al menos dos residuos de Serina en las posiciones 638 y 878. De igual forma se comprobó que ambas proteínas se asocian físicamente en células de cáncer de mama triple negativo. Bajo esta premisa es importante evaluar el efecto de la fosforilación de c-ABL mediado por PAK1 en procesos celulares implicados en la oncogénesis y progresión del cáncer de mama para considerar a estas moléculas potenciales blancos terapéuticos ya que su inhibición puede resultar benéfica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer especialmente aquellos tumores en los que ambas proteínas se sobreexpresan como es el caso del triple negativo. El estudio detallado de los mecanismos moleculares por los cuales PAK1 promueve la transformación celular, así como los efectos de su inhibición en modelos celulares, potencialmente podría ayudar a mejorar el diseño de terapias combinadas para el tratamiento del cáncer de mama de una manera más efectiva.

3. HIPOTESIS

La proteína cinasa PAK1 es importante para el desarrollo de tumores de mama triple negativo, por lo que la inhibición combinada de esta enzima y su potencial sustrato c-ABL, resultaría más efectiva para detener la progresión tumoral que las terapias con un solo agente farmacológico.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL en distintos procesos celulares implicados en la progresión de tumores de mama triple negativo.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si PAK1 co-localiza con c-ABL en un contexto celular.
2. Evaluar si existe una correlación en los niveles de expresión de PAK1 y c-ABL en biopsias de cáncer de mama humano.
3. Evaluar el efecto de la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL en la sobrevivencia, apoptosis, migración e invasión en células de cáncer de mama triple negativo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CULTIVO CELULAR

5.1.1 MDA-MB-231

La línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 se cultivó en medio DMEM (BIOWEST). Este medio se complementó con suero fetal bovino al 10% (GIBCO) y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada en una atmósfera de CO₂ al 5% / aire al 95%.

5.1.2 CULTIVO PRIMARIO ECL-1

La línea ECL-1 fue donada por el Dr. Alejandro Zentella Dehesa del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, estas células son un cultivo primario de células de cáncer de mama del subtipo triple negativo obtenidas de una paciente mexicana de 53 años de edad, las cuales se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO) y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37° C en una incubadora humidificada en una atmósfera de CO₂ al 5% / aire al 95%.

5.1.3 MCF-10A

La línea celular de epitelio mamario no transformado MCF-10A se cultivó en medio DMEM/F12 (BIOWEST). Este medio se complementó con suero fetal bovino al 10% (GIBCO) y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada en una atmósfera de CO₂ al 5% / aire al 95%.

5.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las concentraciones de proteína total se midieron a partir de los lisados celulares obtenidos a partir de una confluencia del 80% mediante el método Lowry,

el que se basa en la reacción de Cu^{2+} producido por la oxidación de enlaces peptídicos, utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se construyó una curva estándar utilizando albúmina de suero bovino entre las concentraciones de 0 a 1 mg/ml. Se tomaron lecturas de absorbancia a 750 nm y todas las muestras se midieron por triplicado [85]. Se añadió amortiguador de Laemmli 6X (Tris-HCl 375 mM pH = 6,8, SDS al 9%, glicerol al 50%, beta-mercaptoetanol al 9%, bromofenol al 0,03% azul) a los extractos proteicos a una concentración final de 1X y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.3 SDS-PAGE

Para determinar la concentración de proteínas totales PAK1 y c-ABL en ambas líneas celulares, se separaron 30 μg de extractos proteicos en geles de SDS-poliacrilamida (30%). El gel de resolución se preparó con las siguientes concentraciones finales: acrilamida al 10%, bis-acrilamida al 1%, base Tris 375 mM pH = 8,8 y SDS al 0,1%. Para lograr la polimerización del gel se añadió persulfato de amonio al 0,05% y TEMED al 0,003%. En cuanto al gel concentrador, las concentraciones finales fueron: acrilamida 4%, bis-acrilamida 0,1%, tris base 125 mM pH = 6,8 y SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,005%. La electroforesis se inició utilizando un tampón de corrida (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%) y la separación se realizó a un voltaje constante de 120 V [86]. Una vez que se completó la migración, se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se realizó la transferencia a una membrana de PVDF.

5.4 “WESTERN BLOT”

Las proteínas separadas electroforéticamente en un gel SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF como describió Towbin [87]. Para realizar el blotting, se preparó un sandwich de transferencia empleando el sistema Trans-Blot Turbo Transfer (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del proveedor [88], brevemente: en un casete se colocaron 6 papeles Whatman humedecidos previamente con amortiguador de transferencia, luego la membrana de PVDF, seguido del gel y finalmente 6 papeles Whatman humedecidos con amortiguador de transferencia. Al montar este sándwich se tuvo cuidado de no dejar burbujas que pudieran interferir

con la transferencia de las proteínas a la membrana. La transferencia de proteínas se realizó desde el polo negativo (gel) al polo positivo (membrana de PVDF). El casete se cerró cuidadosamente y se colocó dentro del Trans-Blot. La transferencia se realizó siguiendo el protocolo establecido por el proveedor tomando en cuenta el peso de las proteínas a transferir. Una vez completada la transferencia y para verificar la presencia de las proteínas, la membrana se tiñó con una solución de rojo Ponceau al 0,5% en ácido acético al 2% durante 5 min a temperatura ambiente y se lavó con agua destilada. Una vez que se corroboró la transferencia de las proteínas, las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5% en TBS-Tween 0,1% (base Tris 50 mM, pH = 7,5, NaCl 150 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario. [anti- c-ABL 1:1000 (Abcam), anti-PAK1 1: 1.000) (Cell Signaling Technologies)] en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces cada 15 min con TBS-Tween al 0,1%. Después del último lavado, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti- ratón o anti-conejo (1: 10.000) conjugado con peroxidasa de rábano durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados más de 15 minutos con TBS-Tween al 0,1%. Las membranas se sumergieron en 1 ml de solución desustrato ECL Clarity Western (BIO-RAD). Después de este tiempo, las membranas se expusieron a una película de autorradiografía HyBlot ES® (Denville Scientific Inc.).

5.5 CO-LOCALIZACIÓN DE PAK1 Y C-ABL

Se empleó la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 para determinar si existe co-localización entre las proteínas endógenas c-ABL y PAK1, una vez obtenida la confluencia adecuada (80%) las células fueron sembradas sobre cubreobjetos y después de 24 horas de crecimiento las células fueron fijadas durante 30 min con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, lavadas 3 veces con glicina 100 mM en PBS y permeabilizadas durante 15 min con PBS-Triton X-100 al 0.5%, posteriormente las laminillas se bloquearon con BSA al 5% en PBS-Tritón X-100 al 0.1%. Una vez bloqueadas, las laminillas se incubaron con anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas PAK1 (dilución 1:200) y c-ABL (dilución 1:200)

generados en conejo y ratón respectivamente durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las laminillas fueron lavadas 3 veces con glicina 100 mM en PBS e incubadas con anticuerpos secundarios anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 594 para detectar a PAK1 en rojo (dilución 1:200) y anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 488 para detectar a c-ABL en verde (dilución 1:200) durante 45 min en oscuridad. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (dilución 1:500) disuelto en solución de lavado durante 7 min, se realizaron 3 lavados y las laminillas se montaron con resina Vectashield. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal TCS SPB (Leica) y la co-localización de ambas proteínas fue calculada empleando el software Image J.

5.6 NIVELES DE EXPRESIÓN DE PAK1 Y C-ABL EN TUMORES DE MAMA HUMANOS.

Con el propósito de determinar los niveles de expresión de PAK1 y c-ABL en muestras de tumores de mama humanos, se obtuvieron 50 muestras derivadas de biopsias de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología para efectuar un ensayo preliminar, empleando anticuerpos específicos para ambas proteínas, a la intensidad de la tinción se le asignaron valores de 0 a 3; siendo 0 negativo, 1 tinción moderada, 2 alta y 3 muy alta. La correlación entre los niveles de expresión de ambas proteínas se evaluó mediante un análisis de correlación de Spearman en el programa GraphPad Prism 8.0.

5.7 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Para determinar la viabilidad celular en la inhibición farmacológica de PAK1 y c-ABL en las células MDA-MB-231 y el cultivo primario de cáncer de mama triple negativo ECL-1 se generaron curvas de sobrevivencia, para lo cual se sembraron 5000 células en una placa de 96 pozos y después de 24 horas de incubación a 37°C se aplicaron las siguientes condiciones de tratamiento:

MDA-MB-231

CONTROLES	TRATAMIENTOS
Medio sin células	IMATINIB: 25 μ M, 20 μ M, 15 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 0 μ M
Medio con células sin tratamientos	FRAX 1036: 0 μ M, 5 μ M, 4 μ M, 3 μ M, 2 μ M, 1 μ M
	COMBO: 25 μ M (IMA)+ 5 μ M (FRAX) 20 μ M (IMA)+ 4 μ M (FRAX) 15 μ M (IMA)+ 3 μ M (FRAX) 10 μ M (IMA)+ 2 μ M (FRAX) 5 μ M (IMA)+ 1 μ M (FRAX)

Tabla 1: Condiciones de controles y tratamientos empleadas para generar la curva de sobrevivencia de los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB) en la línea celular MDA-MB-231. Todas las condiciones fueron realizadas por triplicado.

ECL-1

CONTROLES	TRATAMIENTOS
Medio sin células	IMATINIB: 0.6 μ M, 1.3 μ M, 3.3 μ M, 6.6 μ M, 10 μ M, 13.3 μ M
Medio con células sin tratamientos	FRAX 1036: 0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M
	COMBO: 0.6 μ M (IMA)+ 0.5 μ M (FRAX) 1.3 μ M (IMA)+ 1 μ M (FRAX) 3.3 μ M (IMA)+ 2.5 μ M (FRAX) 6.6 μ M (IMA)+ 5 μ M (FRAX) 10 μ M (IMA)+ 7.5 μ M (FRAX) 13.3 μ M (IMA)+ 10 μ M (FRAX)

Tabla 2: Condiciones de controles y tratamientos empleadas para generar la curva de sobrevivencia de los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB) en el cultivo primario ECL-1. Todas las condiciones fueron realizadas por triplicado.

Las células fueron monitoreadas mediante microscopía cada 24 horas y a las 48 horas se realizó el ensayo colorimétrico de MTT (marca), los resultados obtenidos se analizaron empleado el software informático GraphPad prism 8.0. para el cálculo de la IC50 para cada uno de los inhibidores, ya sea de manera individual o combinada y para la generación de la curva de sobrevivencia. De igual manera se calculó la sinergia entre los inhibidores de acuerdo al método de Chou-Talalay [89] con ayuda del programa computacional CalcuSyn (Biosoft, UK).

5.8 ENSAYO DE APOPTOSIS

Para determinar el efecto de la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL en la apoptosis celular, se realizó un ensayo empleando el kit comercial Caspase-Glo® 3/7 (MARCA), siguiendo las instrucciones del proveedor [90] empleando las células MDA-MB-231 y ECL-1. Brevemente, se sembraron 5000 células por condición en una placa de 96 pozos y después de 24 horas de incubación a 37°C se aplicaron las condiciones de tratamiento empleadas previamente en el ensayo de viabilidad celular para ambos tipos de células, después de 16 horas se añadieron 100 µl de reactivo Caspase-Glo® 3/7 a cada pozo, debido a la sensibilidad del ensayo se tuvo cuidado con no tocar la muestra para evitar contaminación cruzada, posteriormente se mezcló suavemente con un agitador de placas a 500 rpm durante 30 segundos, se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. Finalmente se midió la luminiscencia de cada pozo mediante el luminómetro de microplacas Tecan®, los resultados obtenidos se analizaron empleado el software informático GraphPad prism 8.0.

5.9 ENSAYO DE MIGRACIÓN EN TRANSWELL

Una vez determinadas las IC50, se analizó el efecto de la inhibición individual o combinada de PAK1 y c-ABL en la migración celular mediante la técnica de migración en Transwell empleando las células MDA-MB-231 y ECL-1; se utilizaron placas Transwell® Permeable Supports Corning; en el inserto se colocaron 100,000 células en medio sin suero con los inhibidores de PAK1 (FRAX 1036) y de c-ABL

(IMATINIB) bajo las condiciones observadas en la **Tabla 3 y 4**, en este caso se empleó la IC25 para evitar la muerte de las células y observar únicamente el efecto en la migración; en el pozo inferior se colocó medio con suero como quimioatrayente y se incubó a 37°C durante 24 horas.

MDA-MB-231

CONTROLES	TRATAMIENTOS
Medio con células y vehículo (DMSO)	IMATINIB: 12.5 µM (IC25)
Medio con células sin tratamiento	FRAX 1036: 2.5 µM (IC25)
	COMBO: 12.5 µM (IMA)+ 2.5µM (FRAX)

Tabla 3. Condiciones de controles y tratamientos para el ensayo de migración en Transwell empleando los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB) en la línea celular MDA-MB-231. Todas las condiciones fueron realizadas por triplicado.

ECL-1

CONTROLES	TRATAMIENTOS
Medio con células y vehículo (DMSO)	IMATINIB: 5.1 µM (IC25)
Medio con células sin tratamiento	FRAX 1036: 3.75 µM (IC25)
	COMBO: 5.1 µM (IMA)+ 3.75µM (FRAX)

Tabla 4. Condiciones de controles y tratamientos para el ensayo de migración en Transwell empleando los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB) en el cultivo primario ECL-1. Todas las condiciones fueron realizadas por triplicado.

Después de 24 horas de incubación, las células se fijaron con metanol al 70% durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se hizo la tinción con cristal violeta al 0.2% en etanol al 20% y se dejó teñir por 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción se lavaron los insertos en agua repetidamente para eliminar el exceso de tinte y finalmente se realizó el conteo celular por microscopía óptica tomando 3 campos aleatoriamente por cada condición, de igual forma se realizó

el análisis mediante espectrofotometría para corroborar la reproducibilidad de los resultados. Todos los datos fueron analizados en el software GraphPad Prism 8.0.

5.10 ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA

Para el ensayo de cierre de herida, se sembraron células MDA-MB-231 y ECL-1 en placas de cultivo de 6 pozos. Cuando la confluencia celular alcanzó aproximadamente el 90%, se crearon heridas en las células confluentes utilizando una punta de pipeta de 200 μ l. A continuación, las células se enjuagaron con medio para eliminar las células flotantes y los residuos. Se adicionó medio que contenía los mismos tratamientos empleando de igual manera la IC25 (vehículo, FRAX1036, IMATINIB) individualmente y en combinación, las placas de cultivo se incubaron a 37°C. Se monitoreó el cierre de la herida mediante microscopía en diferentes puntos de tiempo (0 horas, 24 horas) y se tomaron fotografías representativas de cada condición. La capacidad de migración de las células se evaluó midiendo el ancho de las heridas. Las distancias de migración de las células se midieron por la diferencia del ancho de las heridas a las 0 y 24 h. Los datos se analizaron con el software ImageJ y GraphPad Prism 8.0. El experimento se realizó por triplicado.

5.11 ENSAYO DE MIGRACIÓN ALEATORIA

Para el ensayo de migración aleatoria, se sembraron 50.000 células MDA-MB-231 y ECL-1 en placas de cultivo de 6 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Transcurridas 24 horas las células se incubaron en ausencia (control, vehículo) y presencia de los inhibidores PAK1 y c-ABL (FRAX1036, IMATINIB) individualmente y en combinación empleando la IC25 y se incubaron durante 16 horas en la cámara de calentamiento del microscopio Axiovert 200M (ZEISS) a 37°C previamente encendida (2 horas antes) y el módulo de CO₂ se ajustó al 5%. Se encendió la iluminación por microscopía de contraste de interferencia diferencial, se ajustó el objetivo a 20X y se eligieron tres campos en los que había al menos 30 células. Los time-lapse se obtuvieron tomando imágenes cada 5 minutos durante 16 h. Los time-lapse se crearon empleando el software ZEN y los datos obtenidos se analizaron con el software ImageJ, GraphPad Prism 8.0 y Chemiotaxis and migration tool.

5.12 ENSAYO DE INVASIÓN

De igual forma se analizó el efecto de la inhibición individual o combinada de PAK1 y c-ABL en la capacidad de invasión de las células MDA-MB- 231, empleando el kit comercial QCM™ Gelatin Invasipodia Assay (TRITC) y siguiendo la metodología sugerida por el proveedor. Brevemente, se colocaron cubreobjetos redondos de 12 mm en placas de 24 pozos y se les agregaron 250 µL de poli-L-lisina 1X, se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se removió la solución enjuagando 3 veces con PBS estéril usando 500 µL por pozo, posteriormente se agregaron 250 µL de solución de glutaraldehído 1X por pozo y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, se removió la solución y se enjuago 3 veces con PBS estéril usando 500 µL por pozo, se preparó una mezcla 1:5 de gelatina con fluoresceína 1X y gelatina sin fluoresceína 1X, diluida con PBS estéril, se adicionaron 200 µL de la mezcla a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en obscuridad, una vez transcurrido el tiempo se removió la mezcla de gelatina y nuevamente se lavó 3 veces con PBS estéril usando 500 µL por pozo. Para la siembra de las células se utilizó una confluencia de 80% y se sembraron 50,000 células en un volumen de 500 µL por pozo y se dejaron asentars por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Después de 24 horas se aplicaron los tratamientos con los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB), bajo las condiciones observadas en la **Tabla 5**, en este caso se empleó la IC25 para evitar la muerte de las células y observar únicamente el efecto en la invasión.

CONTROLES	TRATAMIENTOS
Medio con células y vehículo (DMSO)	IMATINIB: 12.5 µM (IC25)
Medio con células sin tratamiento	FRAX 1036: 2.5 µM (IC25)
	COMBO: 12.5 µM (IMA)+ 2.5µM (FRAX)

Tabla 5. Condiciones de controles y tratamientos para el ensayo de invasión empleando los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB). Todas las condiciones fueron realizadas por triplicado.

Después de 24 horas de incubación a 37°C con cada uno de los tratamientos se hizo la inmunofluorescencia con Faloidina-Oregon green (dilución 1:500) para observar

el citoesqueleto y con Hoechst (dilución 1:500) para observar el núcleo celular, se montaron con resina Vectashield, se sellaron con esmalte y se dejaron secar durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal y los resultados fueron analizados utilizando el software bioinformático LAS X[®], y Fiji de ImageJ.

5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos representan la media (\pm DE) obtenida de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticos se calcularon mediante pruebas paramétricas de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis, tomando valores de P de 0,05 de significancia. Además, se realizaron los análisis de correlación de Pearson y de superposición de Manders para evaluar la correlación y las distribuciones entre la fluorescencia de PAK1 y c-ABL en los ensayos de co-localización, empleando el software estadístico R.

6. RESULTADOS

6.1 PAK1 Y C-ABL CO-LOCALIZAN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Con el fin de determinar si PAK1 y c-ABL co-localizan en un contexto celular se empleó la línea celular MDA-MB-231 en la cual existe una sobreexpresión de ambas proteínas. En la **Figura 8**, se presenta una inmunofluorescencia representativa en donde se observa que existe co-localización entre PAK1 y c-ABL, en rojo se observa PAK1, en verde a c-ABL y el MERGE representa la superposición de ambas proteínas en este caso se pueden apreciar algunos puntos amarillos que pueden indicar co-localización, sin embargo, para verificar estos resultados se realizó una estimación cuantitativa de co-localización de ambas proteínas empleando el software informático ImageJ, en este análisis se observó que la distribución de PAK1 se superpuso estrechamente con la de c-ABL indicado por los coeficientes de superposición de Manders (M1 y M2) que resultaron de 0.940 y 0.945 respectivamente, por otro lado las distribuciones de fluorescencia rojo (PAK1) y verde (c-ABL) revelaron una correlación positiva entre ambas señales indicado por

el coeficiente de correlación de Pearson con un valor de 0.81. Estos resultados en conjunto indican que PAK1 y c-ABL están co-localizando en un contexto celular y sugiere estrechamente que ambas proteínas podrían estar interactuando en este contexto.

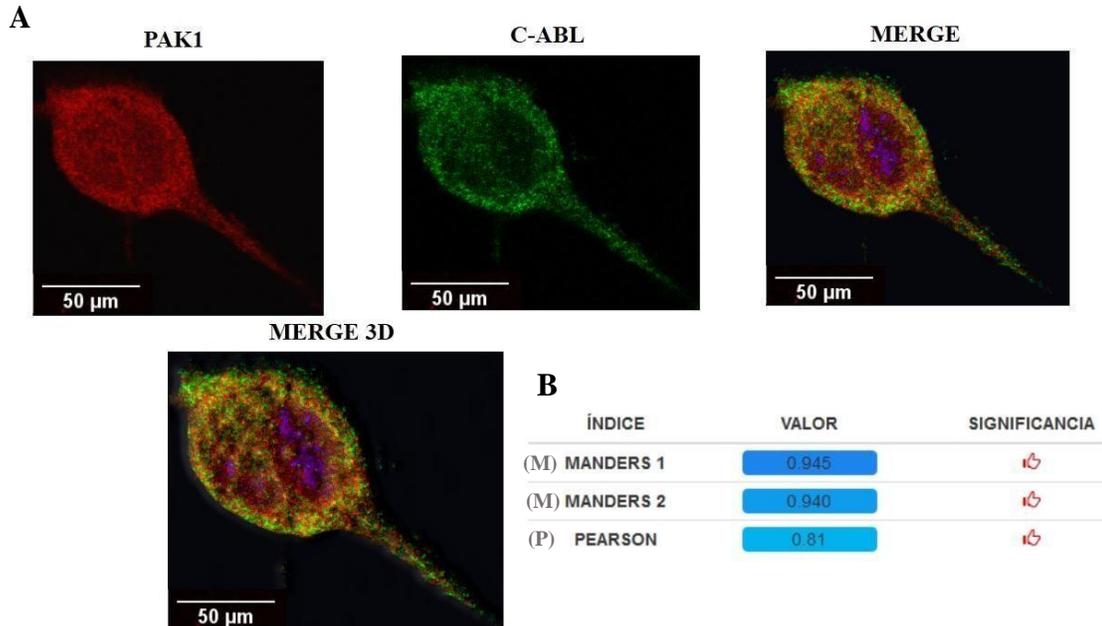


Figura 8. Co-localización de PAK1 y c-ABL en un contexto celular. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en las células MDA-MB-231 empleando anticuerpos primarios anti PAK1 (conejo) y anti c-ABL (ratón) y anticuerpos secundarios anti conejo conjugado con Alexa fluor 594 para detectar a PAK1 en rojo y anti ratón conjugado a Alexa fluor 488 para detectar a c-ABL en verde. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. En la figura se observa a PAK1 en rojo, a c-ABL en verde y la superposición de ambas señales (MERGE y MERGE 3D) (A) en donde se pueden apreciar puntos amarillos que sugieren co-localización. De igual forma se observan los valores del coeficiente de correlación de Pearson que indica una correlación positiva en ambas señales de fluorescencia. ($P \leq 1$) y el índice de superposición de Manders con valores de 0,940 y 0,945 que indica un alto grado de superposición de ambas proteínas. ($M \leq 1$) (B). Imágenes procesadas con el software LAS X®, ImageJ Fiji. Aumento 63X. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

6.2 ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PAK1 Y C-ABL EN TUMORES DE MAMA HUMANOS

Para poder determinar si existe una correlación entre los niveles de expresión de PAK1 y c-ABL en 50 muestras de tumores de mama de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología. En la **Figura 9**, se observan imágenes representativas de secciones seriales de un tumor con tinción negativa para ambas proteínas, y de un tumor positivo para PAK1 y c-ABL (**A**). De igual forma se presenta una gráfica de barras y bigotes, en la que se observa que los pacientes que presentan niveles de expresión altos y muy altos de PAK1 también presentan niveles de expresión similares de c-ABL (**B**), lo que demuestra que hay una correlación estadísticamente significativa en sus niveles de expresión en muestras clínicas de cáncer de mama humano.

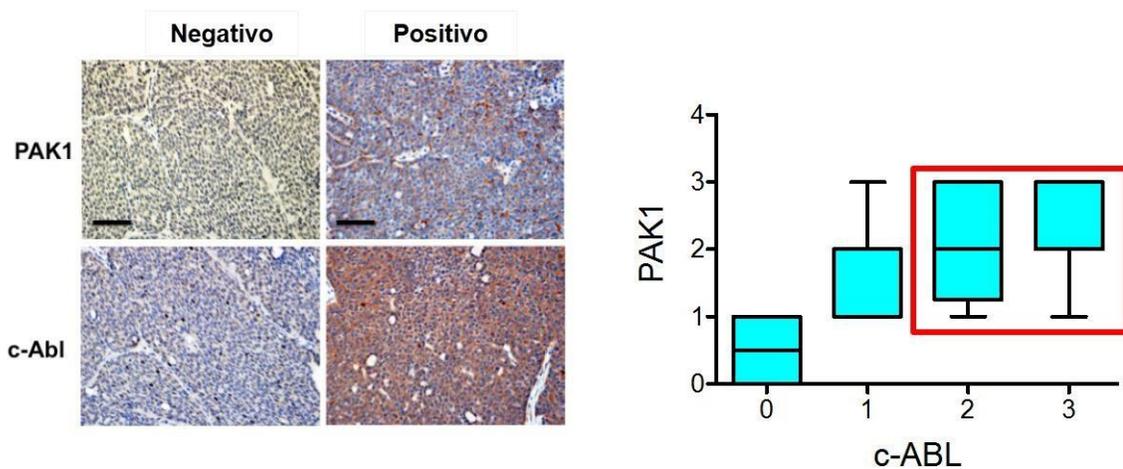


Figura 9. Niveles de expresión de PAK1 y c-ABL en muestras de tumores de mama humanos. Se realizó un análisis por inmunohistoquímica de la expresión de PAK1 y c-ABL en 50 muestras de tumores de mama humanos. A la intensidad de la tinción se le asignó un valor de 0 a 3; siendo 0 negativo, 1 tinción moderada, 2 alta y 3 muy alta, el análisis de imagen se efectuó mediante microscopía óptica y el índice de correlación de Spearman se efectuó con ayuda del software GraphPad Prism 8.0. Las imágenes muestran ejemplos representativos de secciones seriales de un tumor con tinción negativa para ambas proteínas, y de un tumor positivo para PAK1 y c-ABL (**A**). Se presenta una gráfica de barras y bigotes en la cual se

observan niveles de expresión similares de ambas proteínas en muestras de pacientes (B).

6.3 LA INHIBICIÓN COMBINADA DE PAK1 Y C-ABL DISMINUYE LA SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.

Para poder determinar el efecto de la inhibición individual y combinada de PAK1 y c-ABL en la sobrevivencia celular, se generaron curvas de sobrevivencia y se calculó la IC50 para cada uno de los inhibidores, de manera individual o combinada.

En la **Figura 10** se presenta la curva de sobrevivencia en presencia de los inhibidores de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB) de manera individual y combinada a diferentes concentraciones y los valores de IC50 para cada uno de ellos. Se observa que en las células MDA-MB-231 al emplear los inhibidores de manera individual hay una reducción en la sobrevivencia dependiente de la dosis. Cuando se emplea la combinación de ambos inhibidores se observa una disminución en la sobrevivencia mayor que la observada con los fármacos por separado, sin embargo, no se observa un efecto sinérgico, pues en esta condición se esperaría que la disminución de la sobrevivencia estuviera potencializado bajo los estándares de Chou Talalay, en la curva se observa únicamente la sumatoria del efecto de ambos fármacos por separado (**Figura 10A**). Para poder corroborar estos datos se realizó un análisis de sinergismo empleando el método de Chou Talalay con ayuda del software informático CalcuSyn (Biosoft UK) y el análisis arrojó que tal y como se observó en las gráficas de sobrevivencia existe un efecto aditivo en casi todas las concentraciones, sin embargo, en las concentraciones más altas de ambos inhibidores (IC50) se observó un efecto ligeramente sinérgico (**Figura 11A**).

Por otro lado, en el cultivo primario de células ECL-1 al emplear los inhibidores de manera individual se reduce la sobrevivencia de manera importante en comparación con los controles donde no se aplicó ninguna concentración de fármaco; mientras que con la combinación de ambos inhibidores hubo una disminución en la sobrevivencia mayor que al emplear los fármacos por separado y en este caso hubo mayor diferencia que en la línea celular MDA-MB-231 existe un efecto sinérgico aparente bajo los estándares de Chou Talalay (**Figura 10B**). El análisis de sinergismo acorde al método de Chou Talalay indicó que tal y como se observó en las gráficas de sobrevivencia existe un efecto sinérgico en casi todas las concentraciones, únicamente en dos concentraciones (0.6 μ M, 1.3 μ M) el efecto fue ligeramente aditivo (**Figura 11C**). De igual forma la combinación de los fármacos favorece la reducción de dosis para cada uno de ellos lo que conduce a una toxicidad reducida mientras se mantiene la eficacia deseada tanto en las células MDA-MB-231 como en las ECL-1 (**Figura 11B, D**).

En el caso de las células MCF-10A de epitelio mamario no transformado, se observa que como era esperado no hay un efecto significativo de cada fármaco por separado, ni en la aplicación de los fármacos en conjunto, pues no hay una reducción en la sobrevivencia importante en comparación con las células MDA-MB-231 y el cultivo primario ECL-1 donde ambas proteínas se sobreexpresan, además de que no es posible calcular la IC50 con las concentraciones empleadas, probablemente para lograr la reducción de la sobrevivencia en un 50% se requieren dosis más elevadas (**Figura 10C**). Los resultados del análisis estadístico comprobaron que existen diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia celular considerando el tipo de fármacos empleados y las concentraciones usadas para cada uno, así como en la interacción entre estos dos factores, reflejado en valores de P menores a 0.05, esto permite corroborar las diferencias observadas en la gráfica de sobrevivencia.

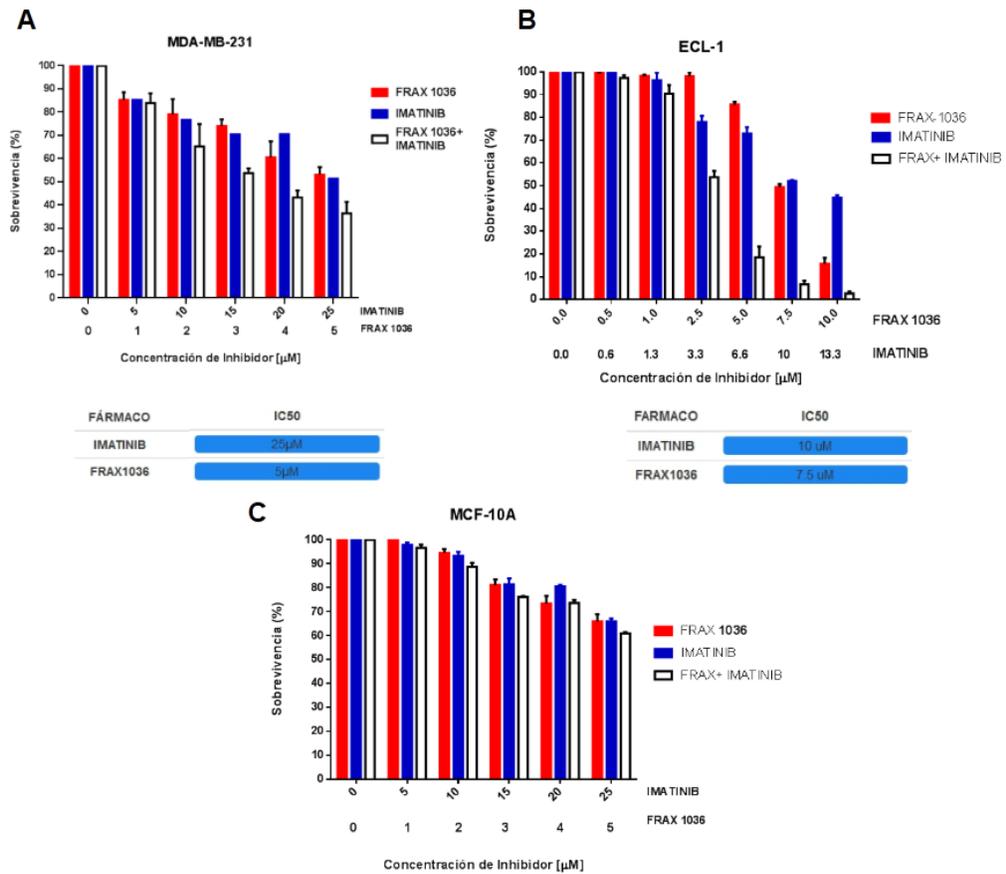


Figura 10. Análisis de sobrevivencia de células de cáncer de mama triple negativo en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL. Se realizó la curva de sobrevivencia en presencia de los inhibidores de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB) de manera individual y combinada en las células MDA-MB-231 (A), ECL-1 (B) y MCF10A (C) en las tablas se presentan los valores de IC50. Se presenta la media y la DE de 3 experimentos * $P \leq 0.05$ en relación al respectivo control sin inhibidor.

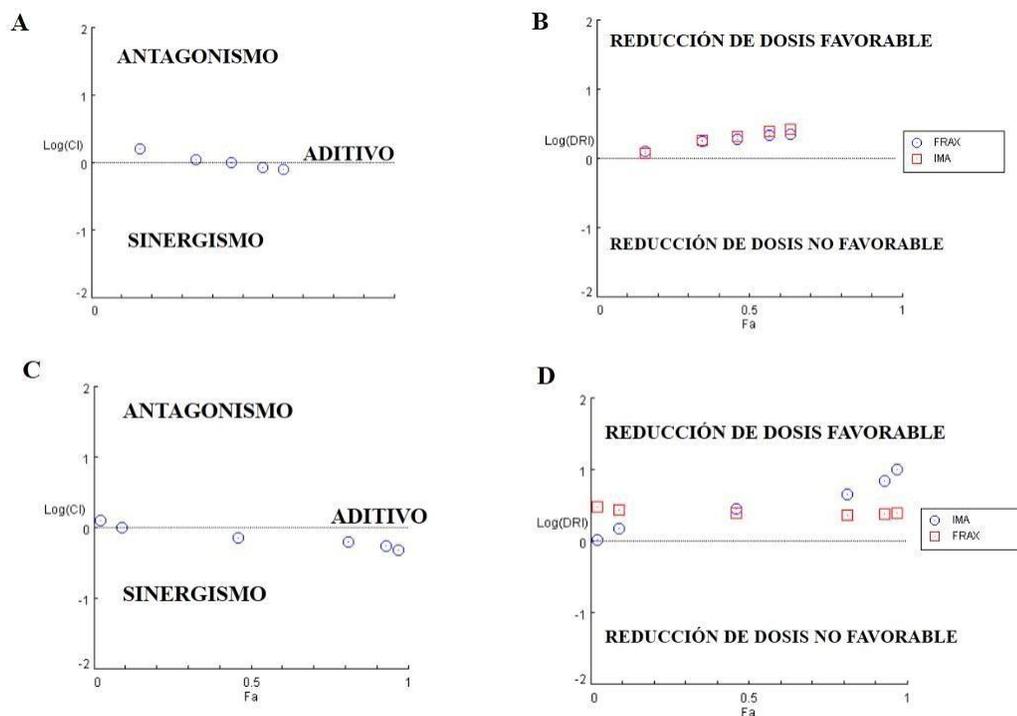


Figura 11. Análisis de sinergia de FRAX-1036 e IMATINIB. Se hizo el análisis de sinergismo siguiendo el método de Chou Talalay empleando el software informático CalcuSyn (Biosoft UK). En la figura se presentan los isobogramas resultantes del análisis de la sinergia entre los fármacos, así como los gráficos de reducción de dosis tanto células MDA-MB-231 (**A, B**) como en ECL-1 (**C, D**), en los isobogramas (**A, C**) cada punto representa la combinación de cada uno de los tratamientos, en el caso de las células MDA-MB-231 (**A**) se observa que la mayoría de los puntos se encuentra en un valor de CI=1 lo cual indica un efecto aditivo. En el caso del cultivo primario ECL-1 (**C**) se observa que la mayoría de los puntos presentan valores de CI <1, lo cual indica un efecto sinérgico. El segundo gráfico (**B, D**) muestra en índice de reducción de dosis (DRI) para cada uno de los fármacos, cada punto representa una dosis de fármaco, tanto en células MDA-MB-231 (**B**) como en ECL-1 (**D**) se observa que todos los puntos para ambos fármacos presentaron una reducción de dosis favorable con valores de DR1>1.

6.4 LA INHIBICIÓN COMBINADA DE PAK1 Y C-ABL INDUCE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.

Para poder determinar el efecto de la inhibición individual y combinada de PAK1 y c-ABL en la apoptosis celular, se realizó un ensayo de apoptosis empleado el kit comercial Caspase-Glo® 3/. En la **Figura 12** se muestran las gráficas de apoptosis empleando los inhibidores de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB) de manera individual y combinada tanto en la línea celular MDA-MB-231 como en el cultivo primario ECL-1. Se observa que en la línea celular MDA-MB-231 al emplear los inhibidores de manera individual hay un aumento en la apoptosis reflejado en los valores de RLU los cuales son proporcionales a el porcentaje de apoptosis presente; en comparación con los controles donde no se aplicó ninguna concentración de fármaco; cuando se emplea la combinación de los inhibidores se observa un aumento en la apoptosis mayor que la observada con los fármacos por separado (**A**). Por otro lado en las células ECL-1 se presenta el mismo efecto observado en la línea celular MDA-MB- 231, sin embargo se observa un efecto mayor en todas las condiciones reflejados en la escala de valores de RLU mayores comparado con la escala de RLU de la línea celular MDA-MB-231 (**B**).

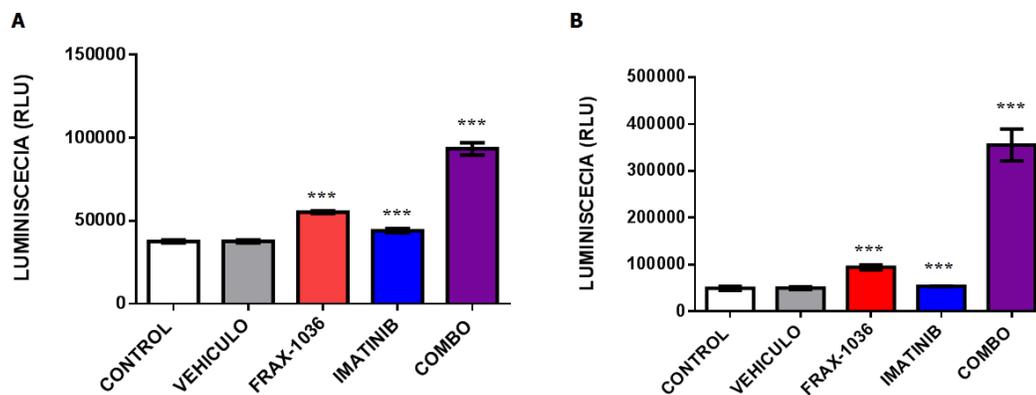


Figura 12. Apoptosis de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y ECL-1 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL. Se realizó un ensayo de apoptosis en las células MDA-MB-231 y ECL-1 con los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB), empleando la IC₂₅ de cada fármaco. En la figura se observa la gráfica de apoptosis utilizando las cinco condiciones experimentales: CONTROL (barrablanca), VEHÍCULO (barragris)FRAX 1036 (barra roja), IMATINIB (barra azul), COMBO (barra morada) en células MDA-MB-231 (**A**) y ECL-1 (**B**). La medición de luminiscencia se realizó mediante el luminómetro de microplacas Tecan®, Los valores de Unidades de Luz Relativa (URL) son proporcionales al porcentaje de apoptosis. Los datos fueron analizados con el software informático GraphPad Prism 8.0

6.5 LA INHIBICIÓN COMBINADA DE PAK1 Y C-ABL DISMINUYE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.

6.5.1 Ensayo de migración en Transwell

En la **Figura 13** se presentan imágenes representativas de los resultados de los conteos celulares después de la aplicación de los tratamientos para cada una de las condiciones en la línea celular MDA-MB-231 (**A**), así como los gráficos correspondientes a los análisis cuantitativos de dichos conteos; se observa que en presencia de los inhibidores de manera individual hay una reducción en el número de células que lograron migrar hasta la membrana inferior del transwell en comparación con los controles en donde se observa un mayor número de células en la parte inferior de la membrana del transwell; en presencia de ambos inhibidores se observó un menor número de células que lograron migrar en comparación con los controles y con los inhibidores por separado (**B**). De igual forma se presentan los datos obtenidos mediante el análisis con espectrofotometría en donde se observa que al igual que en los resultados obtenidos mediante conteo celular la migración de las células se reduce significativamente en presencia de los inhibidores por separado, y que ambos inhibidores en conjunto tienen un efecto mayor en la migración (**C**).

Por otro lado, en la **Figura 14** se presentan imágenes representativas de los resultados de los conteos celulares después de la aplicación de los tratamientos para cada una de las condiciones en el cultivo primario ECL-1 (**A**), así como los gráficos correspondientes a los análisis cuantitativos de dichos conteos; se observa que al igual que en las células MDA-MB-231 en presencia de los inhibidores de manera individual hay una reducción en el número de células que lograron migrar hasta la membrana inferior del transwell en comparación con los controles en donde se observa un mayor número de células en la parte inferior de la membrana del transwell; en presencia de ambos inhibidores se observó un menor número de células que lograron migrar en comparación con los controles y con los inhibidores por separado (**B**). De igual forma se presentan los datos obtenidos mediante el análisis con espectrofotometría en donde se observa que al igual que en los resultados obtenidos mediante conteo celular la migración de las células reduce significativamente en presencia de los inhibidores por separado, y en presencia de ambos inhibidores en conjunto tiene un efecto mayor en la migración (**C**), en conjunto estos resultados demuestran que la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL tienen un efecto significativo en la reducción de migración de células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y en el cultivo primario triple negativo ECL-1.

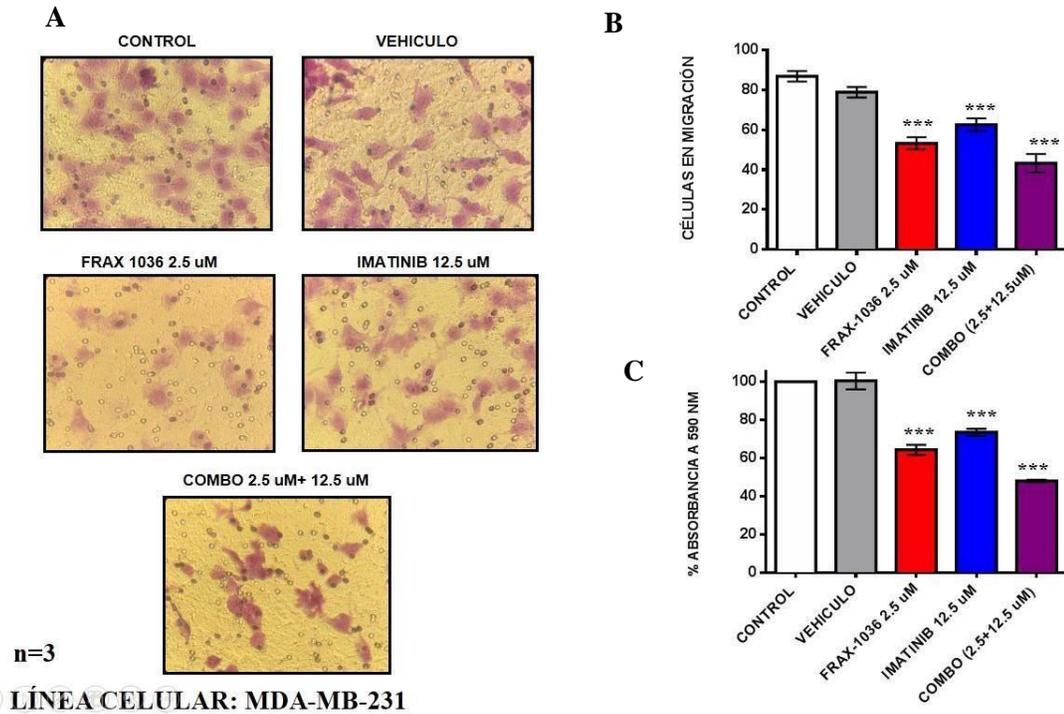


Figura 13. Migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL. Se realizó un ensayo de migración con la técnica de transwell en las células MDA-MB-231 con los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB), empleando la IC₂₅ de ambos fármacos. En la figura se presentan imágenes representativas de los conteos celulares por microscopía óptica con cada una de las condiciones (**A**), así como los gráficos de análisis cuantitativos de los conteos celulares y espectrofotometría (**B**, **C**). Todos los datos fueron analizados empleando el software Fiji de ImageJ y el software bioinformático GraphPad Prism 8.0. Aumento de microscopía óptica 60X.

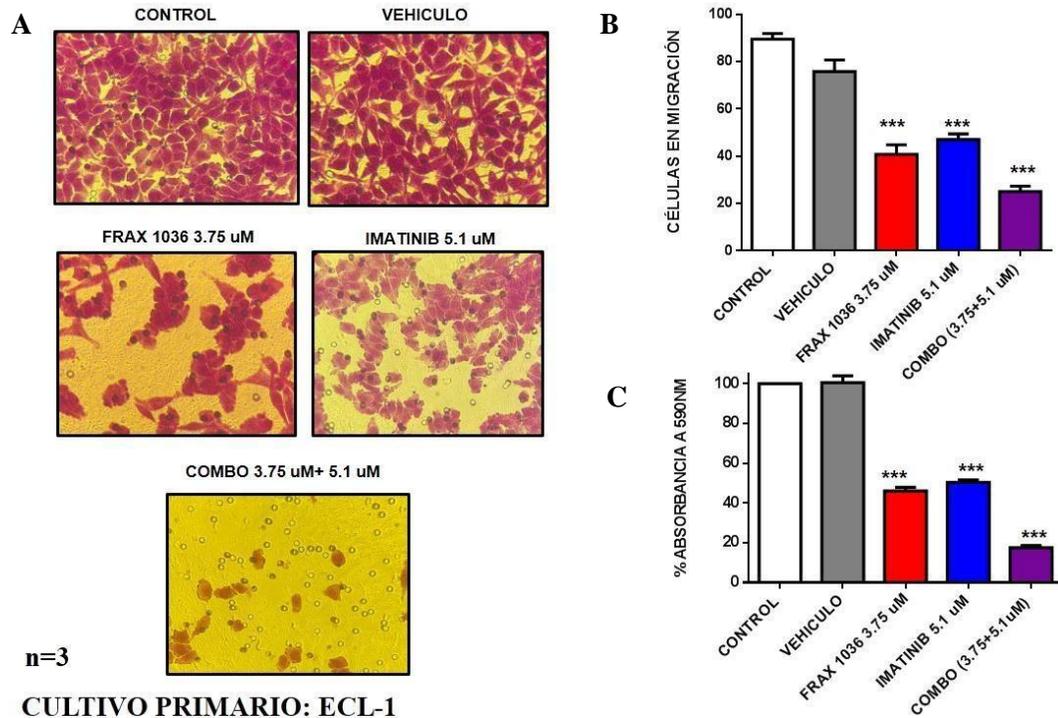


Figura 14. Migración de células de cáncer de mama ECL-1 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL. Se realizó un ensayo de migración con la técnica de transwell con las células ECL-1 y los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB), empleando la IC25 para las concentraciones de ambos fármacos. En la figura se observan imágenes representativas de los conteos celulares por microscopía óptica con cada una de las condiciones (A), así como los gráficos de análisis cuantitativos de los conteos celulares y espectrofotometría (B, C). Todos los datos fueron analizados empleando el software Fiji de ImageJ y el software bioinformático GraphPad Prism 8.0. Aumento de microscopía óptica 60X.

Los resultados del análisis estadístico comprobaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de tratamientos empleadas en la migración celular, reflejado en valores de P menores a 0.05, especialmente en las condiciones de control y en la combinación de fármacos.

6.5.2 Ensayo de cierre de herida

De manera paralela con el objetivo de complementar nuestros hallazgos de migración, también se realizó un ensayo de cierre de herida empleando los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB). Los resultados mostraron que FRAX 1036 e IMATINIB ralentizaron el curso del cierre del espacio de la herida cuando se administraron por separado, mientras que la combinación de los dos ralentizó aún más la progresión en la línea celular MDA-MB-231 (**Figura 15**), de igual forma en el caso del cultivo primario ECL-1 se observó el mismo efecto tanto en la administración de los fármacos por separado como en la combinación (**Figura 16**).

Los resultados del análisis estadístico comprobaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de tratamientos empleadas en la migración celular, reflejado en valores de P menores a 0.05, especialmente en las condiciones de control y en la combinación de fármacos.

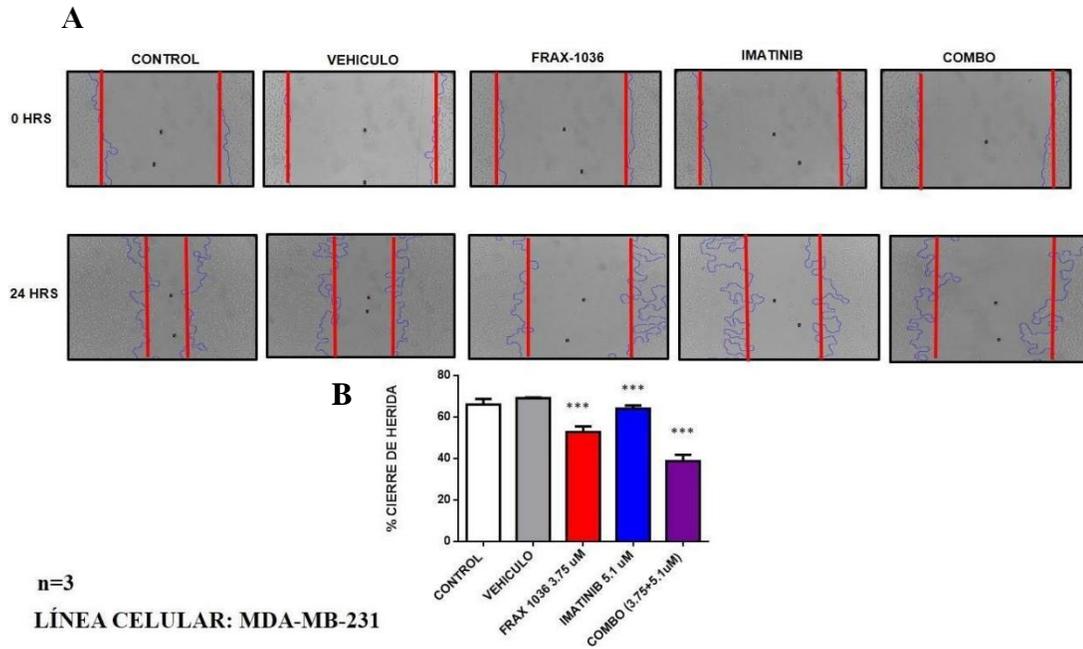


Figura 15. Análisis de cierre de herida de células de cáncer de mama MDA-MB-231 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL. Se realizó un ensayo de cierre de herida en células MDA-MB-231 con los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB), empleando la IC25 de ambos fármacos. En la figura se presentan imágenes representativas del área de la herida a la 0 y 24 hrs después de la aplicación de los tratamientos (A), así como los gráficos de análisis cuantitativos del área de la herida para cada una de las condiciones (B). Todos los datos fueron analizados empleando el software Fiji de ImageJ y el software bioinformático GraphPad Prism 8.0. Aumento de microscopía óptica 60X.

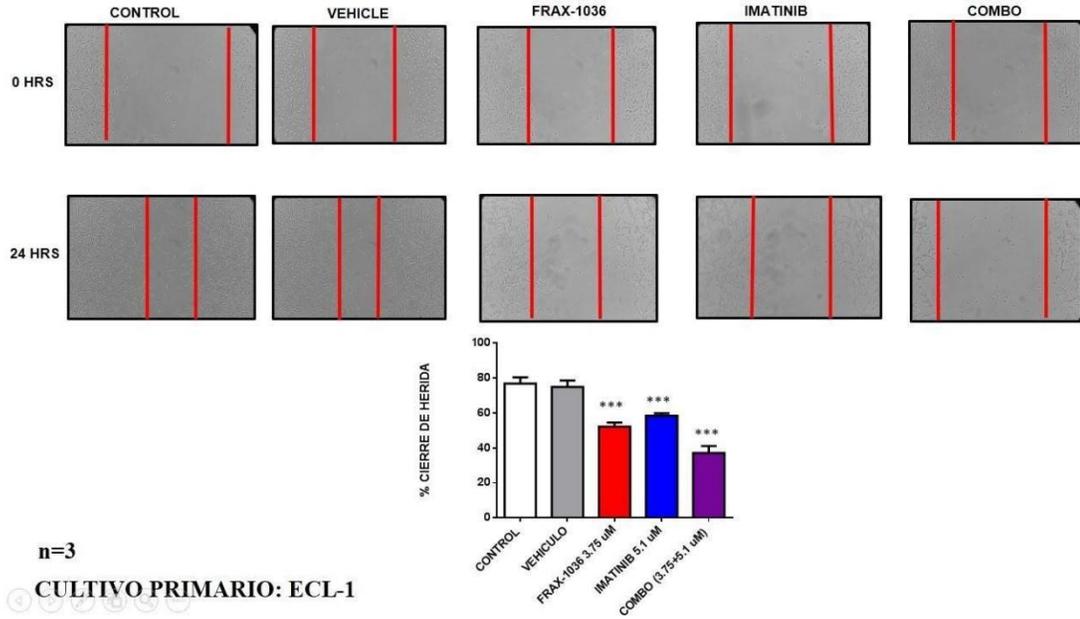


Figura 16. Análisis de cierre de herida de células de cáncer de mama ECL-1 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL. Se realizó un ensayo de cierre de herida en células ECL-1 con los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB), empleando la IC25 de ambos fármacos. En la figura se presentan imágenes representativas del área de la herida a la 0 y 24 hrs después de la aplicación de los tratamientos (A), así como los gráficos de análisis cuantitativos del área de la herida para cada una de las condiciones (B). Todos los datos fueron analizados empleando el software Fiji de ImageJ y el software bioinformático GraphPad Prism 8.0. Aumento de microscopía óptica 60X.

6.5.3 Ensayo de migración aleatoria

Por lo anteriormente observado se realizó un ensayo de migración celular de imágenes directas en tiempo real empleando la línea celular MDA-MB-231 y el cultivo primario ECL-1 empleando los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL(IMATINIB) de manera individual y combinada, se incubaron durante 16 horas en la cámara de calentamiento del microscopio Axiovert 200M (ZEISS) a 37 ° C y se tomaron fotografías cada 5 minutos para la construcción del time-lapse. Los resultados obtenidos demostraron una reducción significativa de la velocidad y la distancia acumulada en la terapia de combinación en comparación con la monoterapia y el control, en las células de cultivo primario ECL-1 (**Figura 17**).

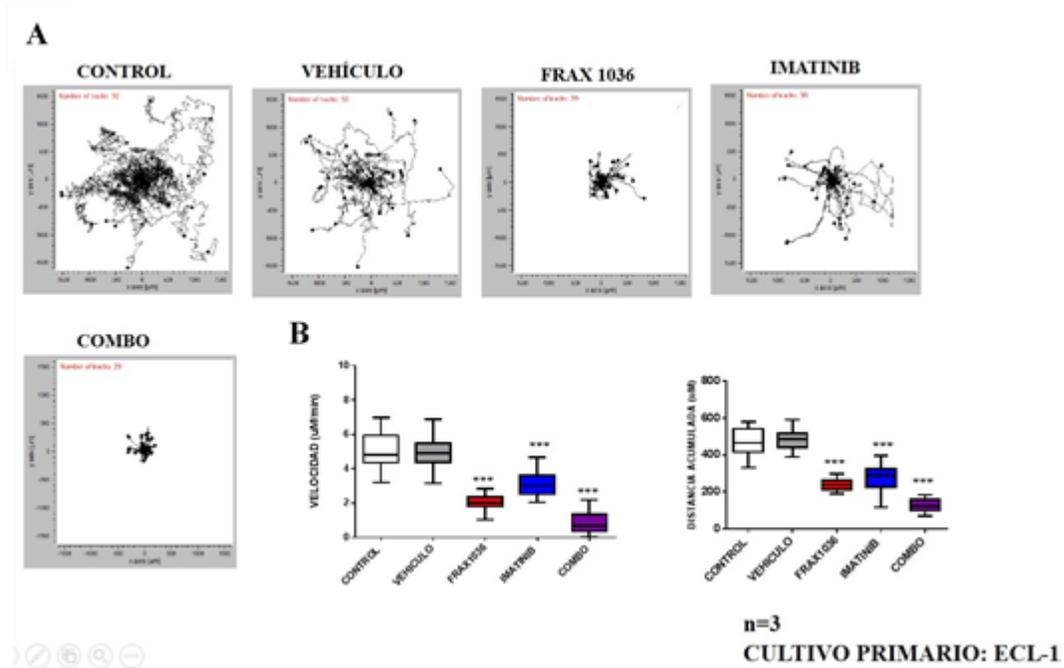


Figura 17. Análisis de migración aleatoria de células de cáncer de mama ECL-1 en la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL. Se realizó un ensayo de migración aleatoria en células ECL-1 con los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB), empleando la IC25 de ambos fármacos. En la figura se presentan los diagramas de trayectoria construidos mediante la selección de 30 células por condición, la trayectoria se construyó a partir de la adquisición de imágenes cada 5 minutos durante 16 horas en tiempo real las cuales fueron procesadas por el software Fiji de ImageJ y el software Chemotaxis and migration tool (**A**), de igual forma se presentan los gráficos resultantes de las media para velocidad y distancia acumulada para cada una de las condiciones empleando el software bioinformático GraphPad Prism 8.0 (**B**).

6.6 LA INHIBICIÓN COMBINADA DE PAK1 Y C-ABL REDUCE LA INVASIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVAS

Con el fin de determinar el efecto de la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL en el proceso de invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 se realizó un ensayo de invasión en gelatina fluorescente QCM™ Gelatin Invasipodia Assay (TRITC).

En la **Figura 18** se muestran imágenes representativas de la formación de invadopodios después de 24 horas de la aplicación de los tratamientos obtenidas mediante microscopía confocal (**A**), así como los gráficos correspondientes a los análisis cuantitativos de la formación de invadopodios para cada condición (**B**), se observa que en presencia de los inhibidores de manera individual existe una reducción en la formación de invadopodios en comparación con el control donde hay un mayor número de invadopodios formados, por otro lado, en presencia de ambos inhibidores en conjunto existe un efecto mayor en la reducción de formación de invadopodios en comparación con el control y los inhibidores por separado; este mismo efecto se obtuvo en los análisis cuantitativos en los cuales se tomaron 10 células por condición para la cuantificación de invadopodios empleando el software Image J, Fiji. Estos datos en conjunto indican que la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL tienen un efecto en la reducción de invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231.

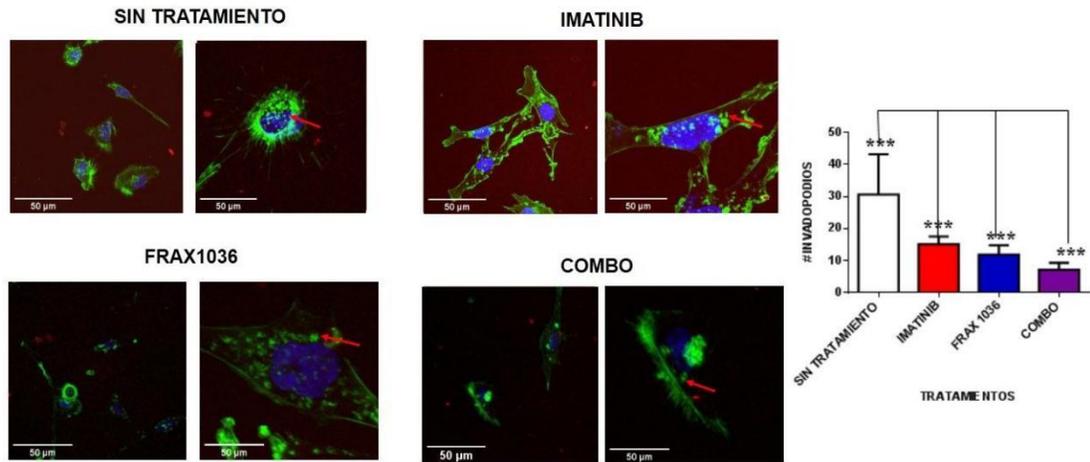


Figura 18. La inhibición combinada de PAK1 y c-ABL disminuye la invasión de células de cáncer de mama. Se realizó un ensayo de invasión siguiendo el protocolo QCM™ Gelatin Invadipodia Assay (TRITC) en células MDA-MB-231 con los inhibidores farmacológicos de PAK1 (FRAX 1036) y c-ABL (IMATINIB), empleando la IC25 de ambos fármacos. En la figura se presentan imágenes representativas de la formación de invadopodios (flecha roja) obtenidas por microscopía confocal, en cada imagen se observa un campo de varias células seleccionadas (izquierda) y el zoom de una sola célula de este campo (derecha) (A), así como los gráficos de análisis cuantitativos de los invadopodios (B). Todos los datos fueron analizados empleando el software bioinformático GraphPad Prism 8.0. Aumento de microscopía confocal 60X.

7. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es un grave problema de salud pública y en México ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad por neoplasias malignas en mujeres mayores de 25 años [9]. Particularmente, el subtipo de cáncer de mama triple negativo representa del 10 al 20% del total de los tumores de mama y se considera uno de los más agresivos al carecer de la expresión de los tres receptores diana: ER, PR y ErbB2 / HER2 y aparecer a muy temprana edad [30]. En la actualidad no hay terapias dirigidas hacia este subtipo a diferencia de los otros, por lo que es necesario profundizar en las actividades y mecanismos involucrados en el inicio y la progresión de este subtipo de cáncer para dilucidar las vías de señalización implicadas en la tumorigénesis.

Es bien sabido que las proteínas cinasas son reguladoras clave de distintos procesos involucrados en el inicio y la progresión tumoral al fosforilar proteínas que participan en vías proliferativas, de migración, progresión del ciclo celular, apoptosis, transcripción génica entre muchas otras; diversos componentes de estas vías de señalización se encuentran sobreexpresados o mutados en células cancerosas por lo que son potenciales blancos de intervención terapéutica [67]. Las principales vías de señalización reguladas por proteínas cinasas en el desarrollo del fenotipo maligno son Ras / RAF / MEK / ERK y PI3K / Akt/ mTOR las que afectan tanto al crecimiento como a la migración de las células tumorales [67]. Estudios recientes han documentado que la señalización a través de todas estas vías puede verse influenciada por las proteínas cinasas activadas por p21 (PAK) del grupo I, una familia de efectores de las GTPasas Rho como Rac y Cdc42 [67].

Particularmente, en cáncer de mama la amplificación del gen de PAK1 resulta de gran relevancia pues esta se asocia con resistencia a terapias como el tamoxifeno y menor sobrevivencia [54]. Estudios recientes empleando ensayos de fosfoproteómica en células deficientes de PAK1 demostraron que algunas moléculas de señalización implicadas en el inicio y progresión tumoral se encuentran hipofosforiladas, incluyendo sustratos conocidos para PAK1 y otros que podrían serlo como es el caso de la proteína cinasa c-ABL. A esta cinasa recientemente se le ha asociado con la progresión del cáncer de mama, debido a que participa en la regulación de la activación

de estructuras de membrana ricas en actina denominadas invadopodios, que promueven la degradación de la matriz extracelular relacionada con invasión celular, una característica importante de las células altamente agresivas como las células triple negativas [67, 90, 91].

En un estudio previo se determinó que las onco-proteínas PAK1 y c-ABL se encuentran sobreexpresadas y se asocian físicamente en células de cáncer de mama triple negativo, además se demostró por primera vez que PAK1 fosforila a c-ABL en los residuos de Serina 638 y 878 *in vitro*. Este fenómeno podría estar involucrado en el mecanismo de activación de c-ABL pues el residuo de Serina 638 se encuentra dentro del bucle de activación de la proteína [77], ésto podría resultar en la activación directa o el mantenimiento de la conformación activa de la proteína promoviendo así la activación de procesos celulares subsecuentes regulados por c-ABL como son la reorganización del citoesqueleto, motilidad celular, sobrevivencia y proliferación [70]. Por otro lado, la fosforilación en estos sitios también puede alterar la ubicación subcelular de la proteína [16], inhibiendo la localización nuclear (donde participa en la reparación del daño del ADN) y aumentando su ubicación en el citoplasma donde ejerce su función tumorigénica [91].

Bajo esta premisa, en el presente estudio se evaluó más a fondo el efecto de la fosforilación de c-ABL mediado por PAK1 en los procesos celulares implicados en la oncogénesis y progresión del cáncer de mama triple negativo donde ambas proteínas se sobreexpresan y asocian físicamente. Aquí se demostró como primer punto que PAK1 y c-ABL co-localizan en células de cáncer de mama triple negativo, lo cual resulta de gran importancia pues además de asociarse físicamente *in vitro*, los análisis de co-localización indican que ambas proteínas se encuentran conjuntamente y que podrían estar interactuando o formando parte del mismo complejo proteico, la localización de ambas proteínas en esta línea celular (MDA-MB-231) es consistente con los hallazgos de diversos estudios que prueban la localización ubicua de c-ABL y PAK1 ubicuamente en la célula y de manera importante en la periferia celular en el caso de c-ABL, donde se produce la polimerización activa de actina promoviendo la reorganización del citoesqueleto y la motilidad celular [93, 94].

En vista de que PAK1 fosforila y se asocia con c-ABL, sugiere el valor potencial de inhibir la actividad de ambas cinasas en tumores que sobreexpresan PAK1 y/o c-ABL como es el caso de los tumores triple negativos.

Aquí, por primera vez, se evaluó el efecto de combinar el inhibidor de c-ABL IMATINIB y el inhibidor de PAK1 FRAX 1036 novedosos en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo; estos inhibidores resultan de gran interés pues en el caso de FRAX 1036 existen un par de estudios en modelos preclínicos de cáncer de mama que demuestran su efectividad en la reducción de sobrevivencia y proliferación de células de cáncer [95] y en el caso de IMATINIB es reciente su uso en tumores sólidos como el de mama pues se considera una terapia estándar en el tratamiento de Leucemia Mieloide crónica [96]. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL disminuye la sobrevivencia, migración y aumenta la apoptosis de células de cáncer de mama triple negativo, tanto en la línea celular triple negativa MDA-MB-231 como en el cultivo primario triple negativo ECL-1. En ambos casos se observa una reducción en la sobrevivencia importante en la aplicación de los fármacos por separado, con un mayor efecto observado en la aplicación de FRAX 1036 versus IMATINIB y una reducción aún mayor en la combinación de los fármacos, esto concuerda con varios estudios que demuestran que FRAX 1036 tiene un efecto citotóxico, es decir, induce apoptosis celular dentro de las primeras 24 horas [95, 97] lo cual se ve reflejado en una reducción de la sobrevivencia importante en el tiempo de los tratamientos aplicados, sin embargo en el caso de IMATINIB se ha observado que no hay un efecto citotóxico, pues no induce apoptosis en un periodo de 24 horas [98], lo cual sugiere que se trata de un efecto citostático que induce arresto del ciclo celular y posterior apoptosis [99], probablemente en periodos más prolongados de tiempo se podría observar un efecto citotóxico al igual que FRAX 1036, para comprobar esto sería necesario realizar ensayos de ciclo celular que comprueben el arresto del ciclo celular después del tratamiento con IMATINIB.

Por otro lado, los ensayos de apoptosis demostraron un aumento importante en la aplicación de los fármacos por separado, con un mayor efecto en la aplicación de FRAX 1036 respecto a IMATINIB lo cual refuerza aún más el hecho de que FRAX

1036 produce un efecto citotóxico e IMATINIB probablemente un efecto citostático; de igual forma se ha observado que PAK1 inhibe la apoptosis en parte a través de la fosforilación del promotor de muerte asociado a Bcl-2 (BAD) en la Ser112 y Ser136 lo que da como resultado una interacción marcadamente reducida entre BAD y Bcl-2 o Bcl-XL. En consecuencia, se inhiben los efectos proapoptóticos de BAD por fosforilación directa de PAK1 [100], esto podría explicar porque al inhibir a PAK1 hay un aumento importante en la apoptosis celular, pues en ausencia de PAK1 se restaura la interacción de BAD y Bcl2 o Bcl-XL promoviendo los efectos proapoptóticos de BAD. Por otro lado, en el caso de IMATINIB se ha observado que en células de cáncer de mama triple negativo no induce apoptosis, pues hay una acumulación de células en la fase G2 / M, y una reducción significativa del número de células en la fase S, lo cual podría indicar un arresto en esa fase del ciclo celular [101, 102]. En otro estudio se observó que IMATINIB induce apoptosis después de las 96 h de tratamiento lo cual puede atribuirse al mecanismo de acción de IMATINIB como inhibidor de RTK, no como agente quimioterapéutico tóxico [102]. Por otra parte, se ha observado que, aunque IMATINIB no induce apoptosis directamente si sensibiliza a las células ante otros agentes lo cual podría explicar la mayor eficiencia observada en la combinación de FRAX 1036 e IMATINIB en comparación con la aplicación de los fármacos por separado. Esto demuestra que la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL reduce significativamente la sobrevivencia de células de cáncer de mama triple negativo, induciendo apoptosis celular.

Por otro lado, se observa un mayor efecto en el cultivo primario respecto a la línea celular, esto podría deberse a que la mayoría de las líneas celulares han estado en cultivo durante décadas y están bien adaptadas al entorno de cultivo bidimensional y, como resultado, a menudo difieren genética y fenotípicamente de su origen tisular y muestran una morfología alterada [103, 101]. A diferencia de las líneas celulares, las células de cultivo primario que se aíslan directamente de los tejidos tienen una vida útil finita y una capacidad de expansión limitada.

Las células de cultivo primario tienen una morfología celular normal y mantienen muchos de los marcadores y funciones importantes vistos *in vivo*, aunque puede resultar más difícil trabajar con ellas, los datos obtenidos mediante el uso de

células de cultivo primario son más relevantes y reflejan el entorno *in vivo* [104] lo que podría explicar el hecho de que exista un efecto mayor en la reducción de la sobrevivencia en las células de cultivo primario ECL-1 respecto a la línea celular MDA-MB-231. No se observó efecto en la sobrevivencia en la línea celular de epitelio mamario no transformado MCF-10A demostrando que las células de cáncer de mama son más sensibles a la inhibición farmacológica de PAK1 y c-ABL que una línea celular no cancerosa.

Se esperaba un efecto sinérgico en la combinación de los fármacos, sin embargo, en la línea celular MDA-MB-231 se observó un efecto aditivo y en el cultivo primario ECL-1 si se observó un efecto sinérgico. El efecto observado en la línea celular MDA-MB-231 podría deberse a que como se mencionó anteriormente: a) FRAX1036 tiene un efecto citotóxico en las células de cáncer de mama [96], observado en los ensayos de apoptosis celular b) que el efecto de IMATINIB, aunque ha sido ampliamente estudiado en leucemias, aún es desconocido para este tipo de células [105]. Sin embargo, se podría tratar de un efecto citostático debido a la reducción en la sobrevivencia pero baja apoptosis celular acorde a los ensayos de apoptosis. Por lo anteriormente mencionado, podría ser que el efecto de ambos inhibidores juntos no sea sinérgico, ya que están actuando por diferentes mecanismos y probablemente tengan diferente afinidad por su diana hablando de un sinergismo de facilitación en donde IMATINIB no es tan potente como FRAX 1036, pero es capaz de aumentar la respuesta farmacológica de FRAX 1036 [106]. Sin embargo, a pesar de que no existe un efecto sinérgico los inhibidores están teniendo una buena respuesta en combinación pues se observa una reducción en la sobrevivencia de más del 50%. En el caso de las células de cultivo primario ECL-1 si se observó un efecto sinérgico, probablemente porque reflejan el entorno *in vivo*.

Finalmente, para observar el efecto que tiene la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL en la migración celular, proceso en el que ambas proteínas están involucradas se realizaron ensayos de migración en transwell, ensayos de cierre de herida y migración aleatoria los cuales demostraron que la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL a) tiene un efecto significativo en la reducción de migración celular, b) ralentiza el curso del cierre del espacio de la herida en células de cáncer de mama triple negativo, c) reduce significativamente la velocidad y la distancia acumulada en células de cáncer de mama triple negativo en comparación con la monoterapia y el control y al igual que

en los ensayos anteriores hay un mayor efecto en las células de cultivo primario que en la línea celular. Esto puede explicarse porque tanto PAK1 como c-ABL participan en programas de señalización encargados de regular la migración celular y al estar inhibidas estos procesos se ven afectados de manera importante [107].

Nuestros resultados en conjunto proporcionan evidencia de que la inhibición combinada de PAK1 y c-ABL podría ser fundamental para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo. La actividad antitumoral mejorada de esta combinación se basa en múltiples mecanismos, incluida la inhibición de la fosforilación de PAK1 en c-ABL, que conlleva a la supervivencia y migración disminuida, así como un aumento en la apoptosis, procesos regulados río abajo de c-ABL. Una limitación de nuestro estudio es que examinamos los efectos de dicha combinación en un modelo *in vitro*; estudios en un modelo *in vivo*, PDX y modelos tridimensionales de cáncer de mama serían útiles para confirmar y ampliar nuestros hallazgos. En nuestro estudio, utilizamos un inhibidor de PAK1/2/3, FRAX 1036. Los inhibidores de PAK1 más nuevos, potentes y selectivos que se encuentran actualmente en desarrollo [108, 109, 110] deben evaluarse en combinación con inhibidores de c-ABL en estudios posteriores. Dados los hallazgos de nuestro estudio, sería de interés la evaluación de la combinación de inhibidores de PAK1 y c-ABL junto con otros agentes dirigidos o quimioterapéuticos.

8. CONCLUSIONES

PAK1 y c-ABL co-localizan en células de cáncer de mama triple negativo.

Existe correlación entre los niveles de expresión de PAK1 y c-ABL en muestras de tumores de mama humanos.

La inhibición combinada de PAK1 y c-ABL reduce significativamente la sobrevivencia, migración, invasión e induce apoptosis en células de cáncer de mama triple negativo tanto en líneas celulares como en células derivadas de cultivo primario.

9. PERSPECTIVAS

Estudiar el efecto de la inhibición farmacológica y con siRNAs de PAK1 en ¿la activación de lossustratos de c-ABL? en células de cáncer de mama triple negativo.

Estudiar el efecto de la fosforilación de c-ABL mediado por PAK1.

Evaluar los niveles de expresión de PAK1 y c-ABL en biopsias de cáncer de mama triple negativomediante microarreglo de tejidos.

Evaluar el efecto de la inhibición combinada de c-ABL y PAK1 en la migración celular medianteensayo de migración aleatoria en la línea celular MDA-MB-231.

Evaluar el efecto de la inhibición combinada de c-ABL y PAK1 en la invasión celular en las célulasdel cultivo primario ECL-1.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*. 2000;100(1):57–70.
2. World Health Organization (OMS. 2017). Recuperado de [<http://www.who.int/topics/cancer/es/>]. Consultado 21/08/17.
3. Bishop, J. M., & Weinberg, R. A. *Scientific American molecular oncology*. New York: Scientific American, 1996.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *cell*. 2011;144(5):646–74.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(1):7–30.
6. IARC, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2008.
7. Akinkuolie AA, Etonyeaku AC, Olasehinde O, Arowolo OA, Babalola RN. Breast cancer patients' presentation for oncological treatment: a single centre study. *Pan Afr Med J*. 2016;24:63.
8. WHO | Breast cancer: prevention and control [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado el 21 de octubre de 2020]. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>
9. Villarreal-Garza C, Mohar A, Bargallo-Rocha JE, Lasa-Gonsebatt F, Reynoso-Noverón N, Matus-Santos J, et al. Molecular Subtypes and Prognosis in Young Mexican Women With Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2017;17(3):e95–102.
10. Cowherd SM. Tumor staging and grading: a primer. *Methods Mol Biol*. 2012;823:1–18.
11. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/, Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. México, DF, 2011.
12. Heng YJ, Lester SC, Tse GM, Factor RE, Allison KH, Collins LC, et al. The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes. *J Pathol*. 2017;241(3):375–91.

13. Perou CM, Sørliie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
14. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(6):698–707.
15. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol*. 2013; 183(4):1113–24.
16. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):412– 24.
17. Guarneri V, Conte P. Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist* 2009;14(7):645–56.
18. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, et al. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2794–803.
19. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *JCO*. 2010;28(20):3271–7.
20. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(27):2817–26.
21. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5678–85.
22. Marchiò C, Natrajan R, Shiu KK, Lambros MBK, Rodriguez-Pinilla SM, Tan DSP, et al. The genomic profile of HER2-amplified breast cancers: the influence of ER status. *J Pathol*. 2008;216(4):399–407.

23. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160–7.
24. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5(1):5–23.
25. Gianni L, Dafni U, Gelber RD, Azambuja E, Muehlbauer S, Goldhirsch A, et al. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(3):236–44.
26. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*. el 2001;344(11):783–92.
27. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Viña JR, Lluch A. Triple-negative breastcancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev*. 2010;36(3):206–15.
28. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19(2):264–71.
29. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008;68(9):3108–14.
30. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367–74.
31. Triple-negative Breast Cancer | Details, Diagnosis, and Signs [Internet]. [citado el 21 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/triple-negative.html>.

32. Radu M, Semenova G, Kosoff R, Chernoff J. PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(1):13–25.
33. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15 Pt 1):4429–34.
34. Anders C. *Understanding and Treating Triple-Negative Breast Cancer*. 2010;12.
35. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275–81.
36. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, et al. Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Res*. 2008;68(9):3108–14.
37. Guarneri V, Broglio K, Kau S-W, Cristofanilli M, Buzdar AU, Valero V, et al. Prognostic Value of Pathologic Complete Response After Primary Chemotherapy in Relation to Hormone Receptor Status and Other Factors. *JCO*. 2006;24(7):1037–44.
38. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275–81.
39. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., Narod, S.A.. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007; 13, 4429– 4434.
40. Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, et al. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med*. 2003;9(5):568–74.
41. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 2012;379(9814):432–44.

42. Gray R, Bradley R, Braybrooke J, Liu Z, Peto R, Davies L, et al. Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials. *The Lancet*. 2019;393(10179):1440–52.
43. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367–74.
44. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*. 1997;57(20):4593–9.
45. Miles D, Chan A, Romieu G, Dirix LY, Cortes J, Pivot X, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of bevacizumab with docetaxel or docetaxel with placebo as first-line therapy for patients with locally recurrent or metastatic breast cancer (mBC): AVADO. *JCO*. 2008..
46. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8(3):193–204.
47. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434(7035):917–21.
48. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen J, Yoffe M, Patt D, Monaghan G, et al. Efficacy of BSI-201, a poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) inhibitor, in combination with gemcitabine/carboplatin (G/C) in patients with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC): Results of a randomized phase II trial. *JCO*. 2009;27(18_suppl):3–3.
49. Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *The Lancet Oncology*. 2007;8(3):235–44.

50. Adjei AA, Hidalgo M. Treating cancer by blocking cell signals. *J Clin Oncol*. 2005;23(23):5279–80.
51. Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(2):263–75.
52. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao Z, Lim L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*. 1994;367(6458):40–6.
53. Bokoch GM. Biology of the p21-Activated Kinases. *Annual Review of Biochemistry*. 2003;72(1):743–81.
54. Whale A, Hashim FN, Fram S, Jones GE, Wells CM. Signalling to cancer cell invasion through PAK family kinases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:849–64.
55. Arias-Romero LE, Chernoff J. A tale of two Paks. *Biology of the Cell*. 2008;100(2):97–108.
56. Radu M, Semenova G, Kosoff R, Chernoff J. PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(1):13– 25.
57. Jaffer ZM, Chernoff J. p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(7):713–7.
58. Baskaran Y, Ng Y-W, Selamat W, Ling FTP, Manser E. Group I and II mammalian PAKs have different modes of activation by Cdc42. *EMBO Rep*. 2012;13(7):653–9.
59. Ha BH, Davis MJ, Chen C, Lou HJ, Gao J, Zhang R, et al. Type II p21-activated kinases (PAKs) are regulated by an autoinhibitory pseudosubstrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(40):16107–12.
60. Adam L, Vadlamudi R, Kondapaka SB, Chernoff J, Mendelsohn J, Kumar R. Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J Biol Chem*. 1998;273(43):28238–46.

61. Brown LA, Irving J, Parker R, Kim H, Press JZ, Longacre TA, et al. Amplification of EMSY, a novel oncogene on 11q13, in high grade ovarian surface epithelial carcinomas. *Gynecol Oncol.* 2006;100(2):264–70.
62. Begum A, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Amagasa T, et al. Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2009;100(10):1908–16.
63. Parsons DW, Wang T-L, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, DeLong L, et al. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature.* 2005;436(7052):792.
64. Wang Z, Fu M, Wang L, Liu J, Li Y, Brakebusch C, et al. p21-Activated Kinase 1 (PAK1) Can Promote ERK Activation in a Kinase-independent Manner. *J Biol Chem.* 2013;288(27):20093–9.
65. Wang Z, Pedersen E, Basse A, Lefever T, Peyrollier K, Kapoor S, et al. Rac1 is crucial for Ras-dependent skin tumor formation by controlling Pak1-Mek-Erk hyperactivation and hyperproliferation in vivo. *Oncogene.* 2010;29(23):3362–73.
66. Higuchi M, Onishi K, Kikuchi C, Gotoh Y. Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway. *Nat Cell Biol.* 2008;10(11):1356–64.
67. Arias-Romero LE, Villamar-Cruz O, Huang M, Hoeflich KP, Chernoff J. Pak1 Kinase Links ErbB2 to -Catenin in Transformation of Breast Epithelial Cells. *Cancer Research.* 2013;73(12):3671–82.
68. Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(8):559–71.
69. Srinivasan D, Plattner R. Activation of Abl Tyrosine Kinases Promotes Invasion of Aggressive Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2006;66(11):5648–55.
70. Khatri A, Wang J, Pendergast AM. Multifunctional Abl kinases in health and disease. *J Cell Sci.* 2016;129(1):9–16.

71. Morrison CD, Chang JC, Keri RA, Schiemann WP. Mutant p53 dictates the oncogenic activity of c-Abl in triple-negative breast cancers. *Cell Death Dis.* 2017;8(6):e2899–e2899.
72. Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janmey PA. The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol.* 1994;124(3):325–40.
73. Miller AL, Wang Y, Mooseker MS, Koleske AJ. The Abl-related gene (Arg) requires its F-actin–microtubule cross-linking activity to regulate lamellipodial dynamics during fibroblast adhesion. *J Cell Biol.* 2004;165(3):407–20.
74. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr–Abl tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2004;5(1):33–44.
75. Hantschel O. Structure, Regulation, Signaling, and Targeting of Abl Kinases in Cancer. *Genes & Cancer.* 2012;3(5–6):436–46.
76. Tanis KQ, Veach D, Duewel HS, Bornmann WG, Koleske AJ. Two Distinct Phosphorylation Pathways Have Additive Effects on Abl Family Kinase Activation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(11):3884–96.
77. Kua H-Y, Liu H, Leong WF, Li L, Jia D, Ma G, et al. c-Abl promotes osteoblast expansion by differentially regulating canonical and non-canonical BMP pathways and p16 INK4a expression. *Nature Cell Biology.* 2012;14(7):727–37.
78. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med.* 2005;353(2):172–87.
79. Hagemeijer A, Graux C. ABL1 rearrangements in T-Cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2010;49(4):299–308.
80. Puls LN, Eadens M, Messersmith W. Current status of SRC inhibitors in solid tumor malignancies. *Oncologist.* 2011;16(5):566–78.
81. Holm C, Rayala S, Jirstrom K, Stål O, Kumar R, Landberg G. Association Between Pak1 Expression and Subcellular Localization and Tamoxifen

- Resistance in Breast Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(10):671–80.
82. Arias-Romero LE, Villamar-Cruz O, Pacheco A, Kosoff R, Huang M, Muthuswamy SK, et al. A Rac-Pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene.* 2010;29(43):5839–49.
 83. Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, Wang R-A, Pestell RG, Vadlamudi RK, et al. p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem.* 2004;279(2):1422–8.
 84. He H, Huynh N, Liu KH, Malcontenti-Wilson C, Zhu J, Christophi C, et al. P-21 activated kinase 1 knockdown inhibits β -catenin signalling and blocks colorectal cancer growth. *Cancer Lett.* 2012;317(1):65–71.
 85. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
 86. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
 87. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350–4.
 88. Trans-blot Turbo Transfer System [Internet]. [citado el 26 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10020688.pdf>
 89. Chou TC and Talalay P, *Advances in enzyme regulation*, 1984. 22: 27-55.
 90. Caspase-Glo® 3/7 Assay System | Caspase 3 Activity Assay | Apoptosis Detection [Internet]. [citado el 26 de diciembre de 2020]. Disponible en: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/
 91. Allington TM, Galliher-Beckley AJ, Schiemann WP. Activated Abl kinase inhibits oncogenic transforming growth factor-beta signaling and tumorigenesis in mammary tumors. *FASEB J.* 2009;23(12):4231–43.
 92. Hayes KE, Walk EL, Ammer AG, Kelley LC, Martin KH, Weed SA. Ablson kinases negatively regulate invadopodia function and invasion in head and neck

- squamous cell carcinoma by inhibiting an HB-EGF autocrine loop. *Oncogene*. 2013;32(40):4766–77.
93. Yuan Z-M, Huang Y, Whang Y, Sawyers C, Weichselbaum R, Kharbanda S, et al. Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage. *Nature*. 1996;382(6588):272–4.
 94. Sossey-Alaoui K, Li X, Cowell JK. c-Abl-mediated phosphorylation of WAVE3 is required for lamellipodia formation and cell migration. *J Biol Chem*. 2007;282(36):26257–65.
 95. Stofega MR, Sanders LC, Gardiner EM, Bokoch GM. Constitutive p21-activated Kinase (PAK) Activation in Breast Cancer Cells as a Result of Mislocalization of PAK to Focal Adhesions. *Mol Biol Cell*. 2004;15(6):2965–77.
 96. Korobeynikov V, Borakove M, Feng Y, Wuest WM, Koval AB, Nikonova AS, et al. Combined inhibition of Aurora A and p21-activated kinase 1 as a new treatment strategy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;177(2):369–82.
 97. Hochhaus A, La Rosée P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia*. 2004;18(8):1321–31.
 98. Ong CC, Gierke S, Pitt C, Sagolla M, Cheng CK, Zhou W, et al. Small molecule inhibition of group I p21-activated kinases in breast cancer induces apoptosis and potentiates the activity of microtubule stabilizing agents. *Breast Cancer Res*. 2015;17:59.
 99. Rappa G, Anzanello F, Lorico A. Imatinib Mesylate Enhances the Malignant Behavior of Human Breast Carcinoma Cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(4):919–26.

100. Anttila JV, Shubin M, Cairns J, Borse F, Guo Q, Mononen T, et al. Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLOS Computational Biology*. 2019;15(11):e1007493.
101. Schürmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, et al. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2000;20(2):453–61.
102. Lo Y-H, Ho P-C, Zhao H, Wang S-C. Inhibition of c-ABL Sensitizes Breast Cancer Cells to the Dual ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Lapatinib (GW572016). *Anticancer Res*. 2011;31(3):789–95.
103. Kadivar A, Ibrahim Noordin M, Aditya A, Kamalidehghan B, Davoudi ET, Sedghi R, et al. Antiproliferative effects of imatinib mesylate on ZR-75-1 and MDA-MB-231 cell lines via PDGFR- β , PDGF-BB, c-Kit and SCF expression Corrigendum. *International Journal of Molecular Medicine*. 2018;42(1):414–24.
104. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(3):443–50.
105. Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res*. 2006;5(4):862–78.
106. Human primary cells versus cell lines: differences and advantages [Internet]. PromoCell. 2019 [citado el 23 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.promocell.com/in-the-lab/human-primary-cells-and-immortal-cell-lines/>

107. Massimino M, Stella S, Tirrò E, Pennisi MS, Vitale SR, Puma A, et al. ABL1-Directed Inhibitors for CML: Efficacy, Resistance and Future Perspectives. *Anticancer Res.* 2020;40(5):2457–65.
108. Massimino M, Stella S, Tirrò E, Pennisi MS, Vitale SR, Puma A, et al. ABL1-Directed Inhibitors for CML: Efficacy, Resistance and Future Perspectives. *Anticancer Res.* 2020;40(5):2457–65.
109. Ndubaku CO, Crawford JJ, Drobnick J, Aliagas I, Campbell D, Dong P, et al. Design of Selective PAK1 Inhibitor G-5555: Improving Properties by Employing an Unorthodox Low-pKa Polar Moiety. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6(12):1241–6.
110. Karpov AS, Amiri P, Bellamacina C, Bellance M-H, Breitenstein W, Daniel D, et al. Optimization of a Dibenzodiazepine Hit to a Potent and Selective Allosteric PAK1 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6(7):776–81.

11. APÉNDICE

Soluciones

Amortiguador de transferencia 1X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Tris	5.8 gr
Glicina	29 gr
SDS	1.0 gr
Metanol	200 ml
H2O destilada	764.2 ml

Amortiguador de corrida Laemmli 10X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Tris	30.3 gr
Glicina	144.2 gr
SDS	10 gr

Disolver en 800ml de agua destilada y aforar a 1 lt, posteriormente ajustar pH 8.3 y almacenar a temperatura ambiente.

Rojo de Ponceau

Reactivo	Volumen (100 ml)
Ponceau	0.5 gr
Ácido acético	1 ml

Aforar con 100 ml de agua destilada.

Azul de Coomassie

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Etanol 96°	450 ml
Ácido acético glacial	50 ml
Azul de coomassie	2.5 gr
H2O destilada	500 ml

Mezclar agua y etanol, posteriormente ácido acético finalmente añadir azul de coomassie, dejar en agitación toda la noche y almacenar en frasco ámbar.

PBS 10X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
NaCl	80 gr
KCl	2.0 gr
Na2HPO4 anhidro	11.5 gr
KH2PO4	2.0 gr

Aforar a 1 lt con agua destilada y esterilizar en autoclave.

TBS 10X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
NaCl	88 gr
Tris	24gr
H2O destilada	990 ml

Ajustar pH a 7.6

TBS-0.1% TWEEN

Reactivo	Volumen (1000 ml)
TBS 10X	100 ml
H2O destilada	900 ml
Tween 20	1 ml

Acrilamida 30%/Bis acrilamida 0.8%

Reactivo	Volumen (100 ml)
Acrilamida	30 gr
Bis acrilamida	0.8 gr
H2O destilada	69.2 ml

Amortiguador RIPA

Reactivo	Concentración
Tris HCl, pH 8.0	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1%
Deoxicolato de sodio	0.5%
SDS	0.1%

Anticuerpos

Anticuerpo	Dilución de anticuerpo primario	Dilución de anticuerpo secundario
Anti-Pak1 (Cellsignal) #2602	1:1000	Anti-rabbit 1:10000
Anti-c-ABL (Abcam)	1:1000	Anti-rabbit 1:10000