

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Papel de la vía de señalización
Pak1/CaMKII como potencial blanco de intervención terapéutica
en cáncer de mama”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

Presentado por:

M. en C. Héctor Iván Saldívar Cerón

Directores de tesis:

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Dr. Luis Enrique Arias Romero

Ciudad de México

Agosto, 2021

ASESORES

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular
CINVESTAV-IPN

Dr. Michael-Schnoor

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular
CINVESTAV-IPN

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular
CINVESTAV-IPN

Dr. Genaro Patiño López

Investigador de Ciencias Médicas “D” del Hospital Infantil de México
“Federico Gómez”

Dr. Alfonso León Del Río

Investigador Titular B del Instituto de Investigaciones Biomédicas
UNAM

Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Luis Enrique Arias Romero, Profesor Titular de la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala UNAM y en el laboratorio de la Dra. Rosaura Hernández Rivas, Investigador Principal del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN.

Este trabajo fue apoyado técnicamente por la Maestra en Ciencias Olga Villamar Cruz.

Durante el desarrollo de esta tesis el estudiante fue apoyado por una beca nacional del CONACYT con número 588927. Este trabajo fue desarrollo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CB-252444 y del apoyo UNAM PAPIIT IN213218.

TABLA DE CONTENIDOS

I. LISTA DE FIGURAS.....	8
II. ABREVIACIONES.....	14
III. ABSTRACT.....	16
IV. RESUMEN.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1. CÁNCER.....	18
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	18
1.3. CÁNCER DE MAMA.....	20
1.4. SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA.....	21
1.4.1. LUMINAL A.....	23
1.4.2. LUMINAL B.....	23
1.4.3. HER2+.....	24
1.4.4. TRIPLE NEGATIVO.....	24
1.5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LAS BIOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA.....	25
1.5.1. FAMILIA EGFR/HER.....	26
1.6. TRATAMIENTOS ACTUALES EN EL CÁNCER DE MAMA.....	26
1.6.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS DEL CÁNCER DE MAMA.....	30
1.7. FAMILIA DE CINASAS PAK.....	33
1.7.1. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA FAMILIA PAK.....	33
1.7.2. BIOLOGÍA DE LAS CINASAS PAK.....	35
1.7.2.1. PAKS Y REMODELACIÓN DEL CITOESQUELETO.....	35
1.7.2.2. PAKS Y FUNCIONES NUCLEARES.....	37
1.7.2.3. PAKS Y PROGRESIÓN EL CICLO CELULAR.....	38
1.7.2.4. PAKS Y REPARACIÓN DEL DAÑO AL DNA.....	38

1.7.3. PAK Y CÁNCER.....	39
1.8. CINASA DEPENDIENTE DE CALCIO CALMODULINA II (CAMKII).....	41
1.8.1. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LAS CAMKII....	41
1.8.2. CAMKII Y CÁNCER.....	42
2. JUSTIFICACIÓN.....	45
3. HIPÓTESIS.....	47
4. OBJETIVO GENERAL.....	48
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	49
5. MATERIALES Y METODOS.....	50
5.1. LÍNEAS CELULARES.....	50
5.1.1. MCF-10A.....	50
5.1.2. MCF-7.....	50
5.1.3. SK-BR-3.....	50
5.1.4. MDA-MB-231.....	50
5.1.5. HEK-293T.....	51
5.1.6. MBCDF-B4.....	51
5.2. PLÁSMIDOS.....	51
5.3. TRANSFECCIONES.....	51
5.4. MODELADO MOLECULAR.....	52
5.5. SILENCIAMIENTO DE PAK1 CON SIRNAS.....	53
5.6. SDS-PAGE.....	53
5.7. WESTERN BLOT.....	54
5.8. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN.....	55
5.9. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	55
5.10. MICROARREGLO DE TEJIDOS DE CÁNCER DE MAMA.....	56
5.11. INMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOPSIAS CONTENIDAS EN MICROARREGLOS DE TEJIDOS DE CÁNCER DE MAMA.....	56
5.12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CAMKII Y PAK1 EN LOS MICROARREGLO DE TEJIDOS.....	57
5.13. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR MTT.....	57
5.14. ENSAYOS DE DETERMINACIÓN DE SINERGISMO.....	57

5.15.	ENSAYO DE ACTIVIDAD RELATIVA DE CASPASA 3 Y 7.....	58
5.16.	ENSAYO DE MIGRACIÓN TIPO TRANSWELL.....	58
5.17.	ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA.....	59
5.18.	ENSAYO DE MIGRACIÓN ALEATORIA EN TIEMPO REAL.....	59
5.19.	ENSAYO DE DEGRADACIÓN DE GELATINA FLUOROSCENTE.....	59
5.20.	ENSAYOS DE ACTIVACIÓN DE RHOA TIPO G-LISA.....	60
5.21.	XENOINJERTOS DE TUMORES.....	60
5.22.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	61
6.	RESULTADOS.....	62
6.1.	PAK1 INTERACCIONA CON CAMKII <i>IN SILICO</i>	62
6.2.	EL SILENCIAMIENTO DE PAK1 CON SIRNA REDUCE.....	66
	SIGNIFICATIVAMENTE LA FOSFORILACIÓN DE CAMKII (PT287	
6.3.	LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PAK1 REDUCE	
	SIGNIFICATIVAMENTE LA FOSFORILACIÓN DE CAMKII (PT287).....	67
6.4.	LA ACTIVACIÓN INDUCIBLE DE PAK1 AUMENTA SIGNIFICATIVAMENTE LA	
	FOSFORILACIÓN DE CAMKII (PT287)	69
6.5.	PAK1 Y CAMKII ESTAN ALTAMENTE EXPRESADOS EN LÍNEAS	
	CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HUMANO Y EN UN CULTIVO	
	PRIMARIO TRIPLE NEGATIVO DERIVADO DE PACIENTE.	69
6.6.	PAK1 Y CAMKII INTERACTÚAN FÍSICAMENTE Y COLOCALIZAN EN UN	
	CONTEXTO CELULAR EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA	
	HUMANO, EN UN CULTIVO PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA Y EN UNA	
	LÍNEA CELULAR NO RELACIONADA.	72
6.7.	PAK1 Y CAMKII SE ENCUENTRAN CO-EXPRESADOS EN LOS	
	DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES EN BIOPSIAS DE CÁNCER DE	
	MAMA HUMANO	76
6.8.	SUSCEPTIBILIDAD DE DISTINTAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE	
	MAMA A LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE PAK1 Y CAMKII.....	81
6.9.	EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS EFECTOS COMBINADOS DE FRAX-	
	1036 MÁS KN-93 MUESTRA UN EFECTO SINÉRGICO EN LA LÍNEA	

CELULAR MDA-MB-231 (TRIPLE NEGATIVO) ASÍ COMO EL CULTIVO PRIMARIO TRIPLE NEGATIVO DERIVADO DE PACIENTE.....	83
6.10. LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036 Y KN-93 TIENEN UN EFECTO TÓXICO EN LINEAS CELULARES DE CANCER DE MAMA Y EN UN CULTIVO PRIMARIO TRIPLE NEGATIVO DERIVADO DE PACIENTE.....	84
6.11. LA INHIBICIÓN FARMACOLOGICA INDIVIDUAL O COMBINADA DE PAK Y CAMKII IMPACTA SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR.....	88
6.12. LA INHIBICIÓN FARMACOLOGICA INDIVIDUAL O COMBINADA DE PAK Y CAMKII DISMINUYE LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN DE LA GTPASA PEQUEÑA RHOA.	93
6.13. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA COMBINADA DE PAK1 Y CAMKII RETRASA EL CRECIMIENTO TUMORAL EN UN MODELO DE XENOTRANSPLANTE ORTOTÓPICO.	95
7. DISCUSIÓN.....	98
8. CONCLUSIONES.....	111
9. PERSPECTIVAS.....	113
10. MODELO PROPUESTO PARA EL PAPEL DE PAK1/CAMKII EN LA MIGRACIÓN, INVASIÓN Y APOPTOSIS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO...	114
11. LISTA DE ANTICUERPOS.	115
12. REFERENCIAS.....	116

I. LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN EL MUNDO

FIGURA 2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN ESTADOS UNIDOS

FIGURA 3. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN MÉXICO

FIGURA 4. MULTICLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE MAMA

FIGURA 5. PATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA E HISTOLOGÍA CONTRA SUBTIPOS MOLECULARES

FIGURA 6.- VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA CARCINOGENESIS DEL CÁNCER DE MAMA

FIGURA 7.- VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CLÁSICAS ACTIVADAS POR RTKS.

FIGURA 8.- TRATAMIENTOS DIRIGIDOS PARA LOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA

FIGURA 9.- MECANISMO DE RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS EN CÁNCER DE MAMA

FIGURA.10 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE CINASAS PAK

FIGURA 11. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LAS CINASAS PAK

FIGURA 12.- SUSTRATOS DE LAS CINASAS PAK VALIDADOS Y SU PAPEL EN LOS PROCESOS BIOLÓGICOS DEL CÁNCER.

FIGURA 13. PROCESOS CELULARES AFECTADOS POR PAK1

FIGURA 14.- MICROARREGLO DE FOSFOANTICUERPOS QUE MUESTRA PROTEÍNAS HIPOFOSFORILADAS EN AUSENCIA DE PAK1.

FIGURA 15.- ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE CAMKII.

FIGURA 16. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR CAMKII EN CÁNCER

FIGURA 17. VISUALIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS PROTEICOS DE LOS PÉPTIDO I Y PÉPTIDO II CON PAK1 UNIDO A ATP.

FIGURA 18. VARIACIONES DE LA DISTANCIA RMSD Y O-(T)- γ P EN LAS SIMULACIONES DE MD CON PÉPTIDOS I Y II.

FIGURA 19. VISUALIZACIÓN DEL COMPLEJO DE CAMKII CON PAK1 UNIDO A ATP CUANDO LOS RESIDUOS DE T277 Y T287 ESTÁN MÁS CERCA DEL GRUPO FOSFATO.

FIGURA 20. VARIACIONES DE RMSD Y DISTANCIA DEL O-(T)- γ P EN LAS SIMULACIONES DE LA DINÁMICA MOLECULAR PARA LOS COMPLEJOS PREDICHOS DE CAMKII-PAK1 DONDE SE ACERCAN LOS RESIDUOS T277 Y T287 AL ATP.

FIGURA 21. EL SILENCIAMIENTO DE PAK1 REDUCE LA FOSFORILACIÓN ACTIVADORA DE CAMKII (PT287)

FIGURA 22. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN FARMACOLOGICA DE PAK1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN ACTIVADORA DE CAMKII (PT287)

FIGURA 23. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE VENUS-UNIRAPR-PAK1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE CAMKII (PT287)

FIGURA 24. EXPRESIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA DE LAS CINASAS PAK1 Y CAMKII EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

FIGURA 25. EXPRESIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA DE LAS CINASAS PAK1 Y CAMKII EN UN CULTIVO PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 26. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE EGF-CAMKII Y CAMKII ENDOGENA EN LA LÍNEA CELULAR HEK-293T MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

FIGURA 27. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE MYC-PAK1 CON EGFP-CAMKII EN LA LÍNEA CELULAR HEK-293T.

FIGURA 28. CO-LOCALIZACIÓN DE MYC-PAK1 CON EGFP-CAMKII EN LA LÍNEA CELULAR HEK-293T.

FIGURA 29. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PAK1 CON CAMKII EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

FIGURA 30. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PAK1 CON CAMKII EN UN CULTIVO DE CÁNCER DE MAMA PRIMARIO.

FIGURA 31. CO-LOCALIZACIÓN DE PAK1 CON EGFP-CAMKII EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 32. ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA PAK1 Y CAMKII EN BIOPSIAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO.

FIGURA 33. LAS CINASAS PAK1 Y CAMKII SE SOBREEXPRESAN EN TEJIDO MAMARIO TUMORAL.

FIGURA 34. EXPRESIÓN DE PAK1 Y CAMKII EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 35. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PAK1 Y CAMK EN CÁNCER DE MAMA HUMANO.

FIGURA 36. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PAK1 Y CAMKII Y EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN EN CÁNCER DE MAMA HUMANO.

FIGURA 37. ENSAYO DE MTT PARA DETERMINAR EL VALOR DE IC50 DE FRAX-1036 Y KN-93 EN DIFERENCIAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 38. ENSAYO DE MTT PARA DETERMINAR EL EFECTO SINERGICO DE LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036 Y KN93 EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.

FIGURA 39. CURVA DE IC (INDICE DE COMBINACIÓN) E IRD (INDICE DE REDUCCIÓN DE DOSIS) POR ECUACIÓN DE CHOU TALALAY PARA LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036/KN93 EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.

FIGURA 40. ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE SINERGIA POR MTT Y CURVA DE IC (INDICE DE COMBINACIÓN) E IRD (INDICE DE REDUCCIÓN DE DOSIS) POR ECUACIÓN DE CHOU TALALAY PARA LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036/KN93 EN UN CULTIVO PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 41. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036 Y KN93 SOBRE LA APOPTOSIS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 42. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036 Y KN93 SOBRE LA APOPTOSIS EN UN CULTIVO PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 43. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE CIERRE DE HERIDA EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 TRATADAS CON FRAX-1036 Y/O KN93.

FIGURA 44. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE CIERRE DE HERIDA EN UN CULTIVO PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON FRAX-1036 Y/O KN93.

FIGURA 45. LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036 Y KN93 REDUCEN LA DISTANCIA ACUMULADA Y VELOCIDAD DE LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.

FIGURA 46. LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036 Y KN93 REDUCEN LA DISTANCIA ACUMULADA Y VELOCIDAD EN UN CULTIVO PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 47. LA COMBINACIÓN FARMACOLÓGICA DE FRAX-1036 Y KN93 INHIBE LA MIGRACIÓN CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.

FIGURA 48. EL COMBO FARMACOLÓGICO DE FRAX-1036 Y KN93 INHIBE LA MIGRACIÓN CELULAR EN UN CULTIVO PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA.

FIGURA 49. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036 Y KN93 SOBRE LA INVASIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.

FIGURA 50. EL COMBO DE FRAX-1036 Y KN93 REDUCEN LA ACTIVACIÓN DE RHOA EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.

FIGURA 51. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA COMBINADA DE PAK Y CAMKII RETRASA LA TUMOROGENICIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO EN UN MODELO MURINO.

FIGURA 52. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA COMBINADA DE PAK Y CAMKII DISMINUYE LA TASA DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y AUMENTA LA TASA DE APOPTOSIS.

II. ABREVIACIONES

ABL	Oncogén aislado de tumores producidos por el virus de leucemia murina de Abelson (<i>“Abelson murine leukemia virus”</i>).
AKT	Oncogén aislado de tumores producidos por el retrovirus murino AKT8.
ATP	Adenosina-5'-trifosfato (<i>“adenosine-5'-triphosphate”</i>).
CAM	Calmodulina.
CaMKII	Proteína cinasa activada por calcio/calmodulina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ERBB	Oncogén de la familia <i>erb</i> de eritroblastosis de aves.
ERBB2	Oncogén de la familia <i>erb</i> de eritroblastosis de aves tipo 2.
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>).
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (<i>“Guanine-nucleotide exchange factor”</i>).
GSK	Cinasa de la glucógeno-sintasa (<i>“Glycogen-synthetase kinase”</i>).
JAK	Cinasa Janus (<i>“just another kinase”</i> , posteriormente redenominada <i>“Janus kinase”</i>).
K	Arginina
KDA	Kilodatón
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos (<i>“Mitogen-activated protein kinase”</i>).
MEK	Cinasa MAPK/ERK (<i>“MAPK kinase/ERK kinase”</i>).
mM	Milimol
ng	Nanogramo
°C	Grados Celcius
PAK	Proteína cinasa activada por p21

PP1	Proteína fosfatasa de tipo 1 (<i>“Protein phosphatase 1”</i>).
RAF-1	Factor activado por ras (<i>“ras activated factor 1”</i>).
RAS	Oncogén aislado de sarcomas murinos inducidos por virus (<i>“retrovirus associated sequence”</i>)
RB	Proteína antioncogénica identificada por su ausencia en retinoblastoma
RP	Receptor de estrógenos (<i>“progesterone receptor”</i>).
RTK	Receptores con actividad tirosina-cinasa (<i>“Receptor tyrosinekinases”</i>).
S	Serina
SOS	<i>“Son Of Sevenles”</i>
SRC	Oncogén derivado del virus de sarcoma de Rous.
STAT	Transductor de señales y activadores de transcripción (<i>“signal transducer and activator of transcription”</i>).
T	Treonina
TCF	Factor del complejo ternario (<i>“Ternary complex factor”</i>).
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
TNBC	Tumor de cáncer de mama triple negativo
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
μg	Microgramo
μL	Microlitro
Y	Tirosina

III. ABSTRACT

p21-Activated kinase-1 (Pak1) is frequently amplified and/or overexpressed in human breast cancer and is required for transformation of breast epithelial cells. Here, we show that Pak1 interacts with and phosphorylates the Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) in the residues T277 and T287, and that pharmacological inhibition or depletion of Pak1 leads to diminished activity of CaMKII. Combined inhibition of Pak1 and CaMKII with small-molecule inhibitors was synergistic and resulted in a dramatic reduction of proliferation, migration and invasion. We found a strong correlation between Pak1 and CaMKII expression in human breast cancer samples, and mice bearing xenografts of triple negative breast cancer cells showed tumor delay when treated with small-molecule inhibitors of Pak or CaMKII. These data delineate a signaling pathway from Pak1 to CaMKII that is required for efficient proliferation, migration and invasion of mammary epithelial cells, and suggest new therapeutic strategies in breast cancer.

IV. RESUMEN

La cinasa activada por p21 (Pak1) se encuentra frecuentemente amplificada y/o sobreexpresada en cáncer de mama humano y es fundamental para la transformación de las células de la glándula mamaria. Aquí, mostramos que Pak1 interactúa y fosforila la proteína cinasa II dependiente de Calcio/Calmodulina (CaMKII) en los residuos T277 y T287, y que el silenciamiento o la inhibición farmacológica de Pak1 conduce a una disminución en la actividad de CaMKII. La inhibición combinada de Pak1 y CaMKII con inhibidores farmacológicos fue sinérgica y resultó en una reducción dramática de la proliferación, migración e invasión. Encontramos una fuerte correlación entre la expresión de Pak1 y CaMKII en muestras de cáncer de mama humano además el modelo murino de xenoinjertos de células de cáncer de mama triple negativo mostró un retraso en el crecimiento tumoral cuando se trataron con inhibidores farmacológicos de Pak o CaMKII. Estos datos delinean una vía de señalización de Pak1 a CaMKII que se requiere para la proliferación, migración e invasión eficiente en las células epiteliales mamarias, y sugiere una nueva estrategia terapéutica en el cáncer de mama.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades interrelacionadas caracterizadas por un crecimiento celular autónomo, el cual cuenta con la capacidad de diseminarse e invadir el organismo llevándolo a la muerte.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es el principal problema de salud pública en el mundo causando más de 10 millones de muertes en el 2020¹. Entre los principales órganos en donde se origina el cáncer, se encuentra la glándula mamaria, el pulmón, el colon, el recto, la próstata, la piel y el estómago. De todos estos tipos de cáncer, el cáncer de mama ocupó el primer lugar en el 2020 a nivel mundial, con 2,261,419 (11.7%) casos nuevos sobre otros tumores como el cáncer de pulmón (11.4%) y esto se observó en ambos géneros y en todas las edades. Sin embargo, en mortalidad el cáncer de mama se ubicó en el quinto lugar (6.9%) por debajo del cáncer de pulmón (18%), el

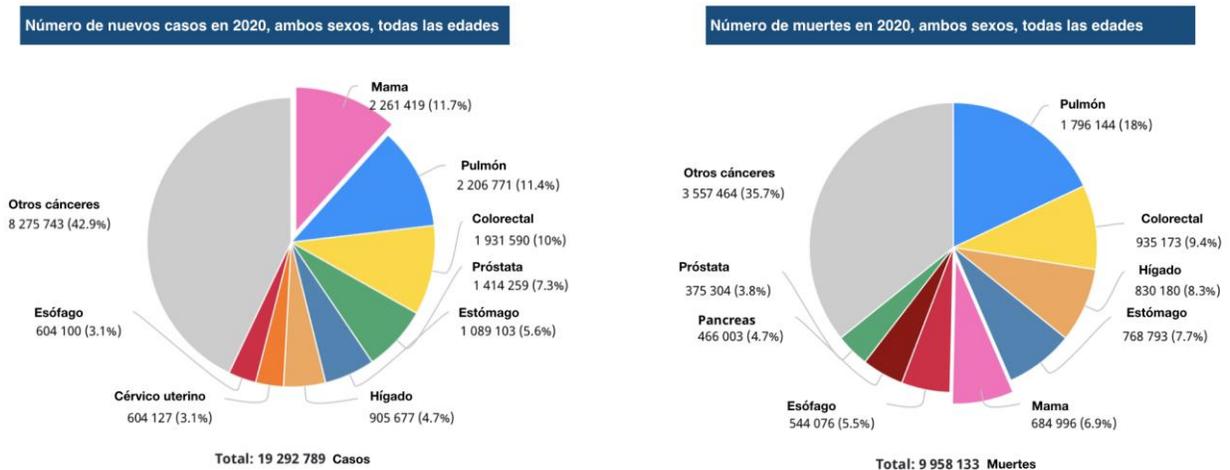


Figura 1. Epidemiología del cáncer en el mundo. A) Número de nuevos casos en 2020, ambos sexos, todas las edades, B) Número de muertes en 2020, ambos sexos, todas las edades. Modificado de Globocan 2020 ².

colorectal (9,4%), el hígado (8.3%) y estómago 6.9%). Lo cual se debió en parte a que la autodetección y a que el diagnóstico temprano del cáncer de mama ha hecho factible un tratamiento oportuno ² (Figura 1).

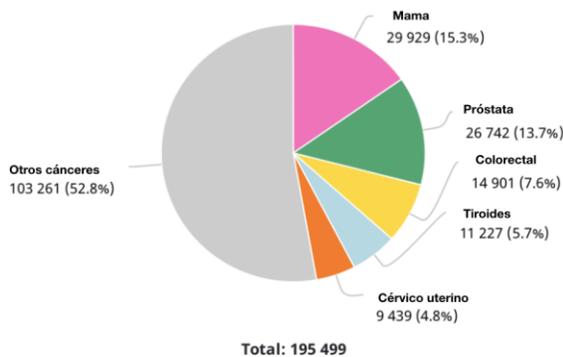
Siguiendo la misma tendencia que a nivel mundial, en países desarrollados como Estado Unidos de América el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y segundo lugar en mortalidad en mujeres mayores de 25 años, con un porcentaje del 30% de casos nuevos y 22% de muertes en el transcurso del 2020 ³ (Figura 2). De acuerdo con Globocan en el 2020, en México se presentaron 29,929 casos de cáncer de mama, representando el 28.2% de todos los tumores en mujeres mexicanas teniendo una tasa de incidencia de 40.5 por cada 100,000 habitantes, sin embargo, a diferencia de lo observado en el mundo, en México el cáncer de mama ocupa el primer lugar en mortalidad (8.8%) por arriba del cáncer de próstata (8.3%), hígado (8.0%) y de pulmón (7.9%), siendo evidente que en México el



Mujer	Nuevos casos	%
Mama	281,550	30%
Pulmón	116,660	13%
Colorectal	69,980	8%
Utero	66,570	5%
Tiroides	35,130	4%
Melanoma	28,480	3%
Linfoma No-Hodgkin	27,830	3%

Figura 2. Epidemiología del cáncer en Estados Unidos. Principales siete tipos de tumores de acuerdo con los nuevos casos estimados en población femenina en Estados Unidos de América, 2021. La clasificación se basa en proyecciones modeladas y puede diferir de los datos observados más recientes. Modificado de Siegel 2021 ³)

Número de nuevos casos en 2020, ambos sexos, todas las edades



Número de muertes en 2020, ambos sexos, todas las edades

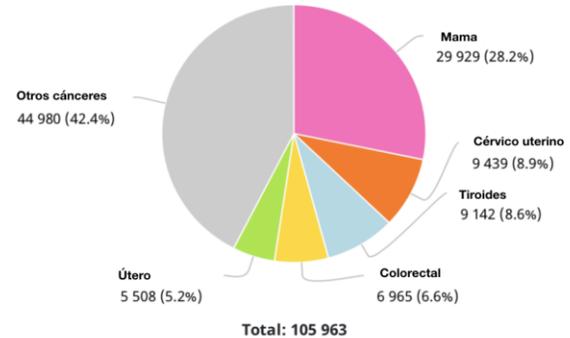


Figura 3. Epidemiología del cáncer en México. A) Número de nuevos casos en 2020, ambos sexos, todas las edades. B) Número de muertes en el 2020, en ambos sexos, y en todas las edades. Modificado de Globocan 2020 ².

diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno del cáncer de mama sigue siendo un reto médico-científico ² (Figura 3).

1.3 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea que comprende una amplia variedad de entidades tumorales con diversos patrones histológicos, características biológicas y distintos ambientes clínicos. Al igual que otros tumores las imágenes histopatológicas son el “estándar de oro” comparados con otros métodos de imagen (mastografía, resonancia magnética, tomografía computada) utilizados para realizar el tamizaje y la pronta detección del tumor ⁴. Actualmente a nivel histopatológico es posible clasificar el cáncer de mama en 8 clases (Figura 4): a) carcinoma ductal, b) carcinoma lobular, c) adenosis, d) fibroadenoma, e) tumores filodes, f) adenoma tubular, g) carcinoma mucinoso y h) carcinoma papilar. Si bien esta clasificación ha sido utilizada por varias décadas, esta solo se basa en la morfo-descripción de las imágenes obtenidas por histología y aunque el sistema de clasificación TNM (“*Tumor, Node, Metastases*”), cáncer de mama ofrece

herramientas para predecir la historia natural de la neoplasia, en el campo clínico se ha demostrado que es pobremente predictor del desenlace del paciente. Esto debido a que la alta heterogeneidad de esta entidad no puede ser explicada únicamente por el tamaño del tumor, la infiltración a ganglios linfáticos y la presencia de metástasis, si no que existen firmas moleculares que hacen a este tumor muy complejo las cuales tienen un significado de pronóstico comprobado ⁵.

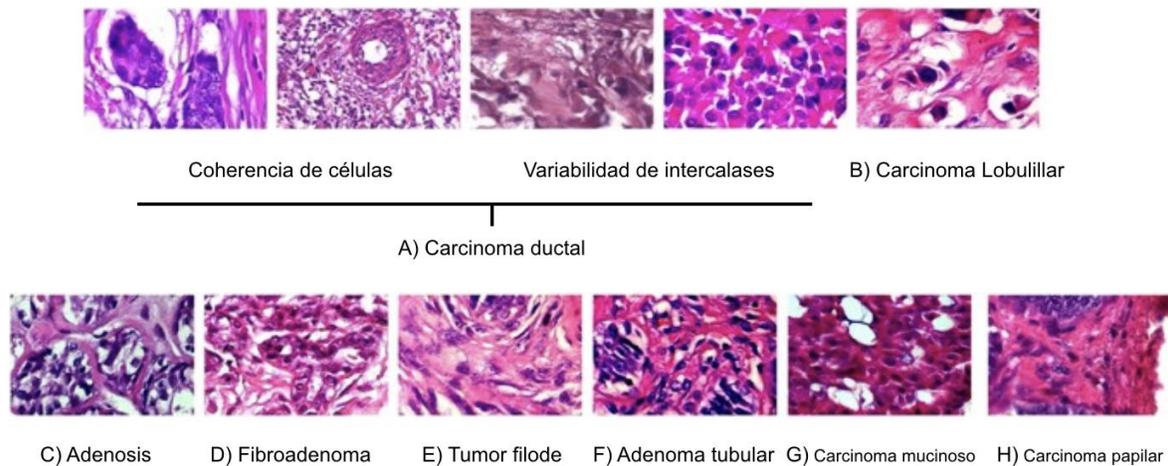


Figura 4. Multiclasificación histológica del cáncer de mama. Ocho clases de imágenes histopatológicas de cáncer de mama de la base de datos BreakHis. Modificado de Shuo Li, 2017.^{4,5}

1.4 SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA

Para analizar las firmas moleculares del cáncer de mama y lograr estrategias terapéuticas más específicas y efectivas diversos grupos de investigación llevaron a cabo microarreglos de mRNA, para identificar si existían perfiles de expresión diferenciales que permitieran subclasificar al cáncer de mama en subtipos moleculares. En el 2000, el grupo de Perou y colaboradores propusieron una nueva clasificación del cáncer de mama basado en los perfiles de expresión génica proveniente de 38 biopsias de cáncer de mama ⁶, este grupo de investigación describió una lista de genes intrínsecos que permitieron identificar 4 subtipos moleculares: luminal, HER2+, “*basal-like*”, y normal. Esto abrió el campo de

investigación en el área de cáncer de mama, surgiendo posteriormente grandes cohortes, reportando que el subtipo luminal se podía dividir en luminal A y luminal B, los cuales tienen pronósticos clínicos diferentes. Aunque se han reportado una gran variedad de subtipos moleculares actualmente se acepta la clasificación basada en cuatro subtipos principales cáncer de mama: luminal A, luminal B, HER2+ y basal ⁷. Sin embargo, en la clínica estas técnicas moleculares no están disponibles y han sido reemplazadas por la evaluación inmunohistoquímica de receptores hormonales (estrógeno y progesterona), HER2+ y Ki67, y ha logrado resultados equivalentes a los obtenidos por expresión génica obteniendo 4 subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2+ y triple negativo ^{8,9} (Figura 5).

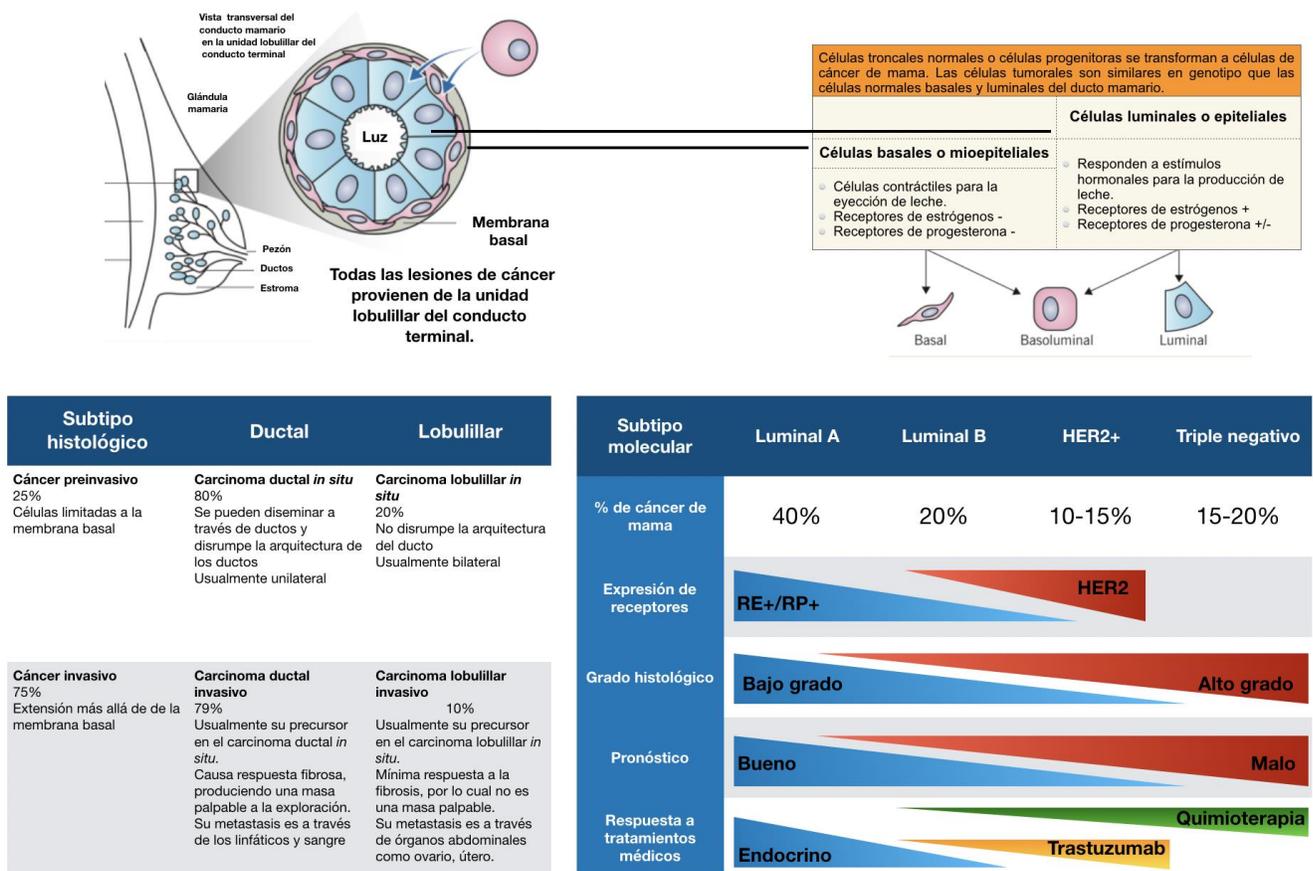


Figura 5. Patogénesis del cáncer de mama e histología vs subtipos moleculares. Modificado de Harbeck, 2019 ⁸.

1.4.1 LUMINAL A

El subtipo Luminal A es el más común y representa cerca del 40-50% de todos los tumores malignos de cáncer de mama, este subtipo se caracteriza por presentar una sobreexpresión de los receptores a estrógeno (RE) y progesterona (RP), una nula expresión del receptor HER2+ y Ki67 <14% o un bajo grado histológico y en comparación a los otros subtipos una reducción en la expresión de genes asociados a la proliferación celular. El subtipo luminal A, conserva algunas características del epitelio luminal mamario como la expresión de citoqueratinas luminales 8/18 aunado a que menos del 20% presentan mutaciones en *TP53*, lo que conlleva a una baja mortalidad y mejor pronóstico. La alta expresión de receptores hormonales lo hace blanco de terapias endocrinas, como el tamoxifeno que compite con los estrógenos por el sitio de unión a ligando en el RE, teniendo respuesta favorable en la mayoría de los pacientes, sin embargo, aunque la tasa de reincidencia es baja, existen pacientes que llegan a reincidir, siendo esto un campo de estudio para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos para estos pacientes ^{10,11} (Figura 5)

1.4.2 LUMINAL B

El subtipo luminal B representa cerca del 20% de todos los tumores malignos de cáncer mama, y al igual que el luminal A, conserva un fenotipo de epitelio mamario con una expresión de receptores hormonales, pero con un aumento en la expresión del receptor HER2+, un grado histológico alto y una alta tasa de proliferación celular (Ki67 >14%). A nivel genómico este subtipo presenta pérdida de copias de *TP53*, *PTEN*, *INPP4B*, *RB1*, *MAP3K1*, *MAP2K4* etc. Aunque fenotípicamente los subtipos luminales son muy similares, a nivel clínico su comportamiento es heterogéneo, el luminal B tiene un mal pronóstico y una baja respuesta a tratamientos endocrinos, sin embargo, su alta tasa de proliferación lo hace, blanco de tratamientos convencionales como quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, estos tratamientos son altamente agresivos para los tejidos no transformados, por lo que la búsqueda de nuevas drogas dirigidas contra este subtipo molecular es un campo nuevo de investigación ^{12,13} (Figura 5)

1.4.3 HER2+

El subtipo HER2+ constituye del 10 al 15% de los tumores malignos de cáncer de mama. El diagnóstico clínico de este subtipo es complicado, ya que en los experimentos de identificación por microarreglos de cDNA este subtipo no solamente presenta una alta expresión de HER2+ y una nula expresión de los receptores hormonales si no que presenta un fenotipo completamente diferente a los luminales siendo su origen las células basales o mioepiteliales del conducto terminal a diferencia de los luminales. El subtipo HER2+ presenta mutaciones en *TP53* (80%), son de grado alto y tienen pésimo pronóstico, sin embargo cuando se llevan a cabo tinciones por inmunohistoquímica o hibridación *in situ* por inmunofluorescencia y son positivos a HER2 comúnmente se catalogan como subtipo HER2+ cuando en realidad se pueden tratar de subtipos luminales con expresión de HER2, lo que conduce a que no se otorgue un tratamiento efectivo. Con base en la alta expresión de este receptor, se han desarrollado terapias dirigidas, como el Trastuzumab el cual es un anticuerpo monoclonal dirigido hacia la región extracelular del receptor HER2, desafortunadamente hasta un 30% de los pacientes presenta resistencia a este grupo de fármacos, por lo cual nuevamente al igual que otros subtipos moleculares es necesario la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra este subtipo molecular ^{14,15} (Figura 5).

1.4.4 TRIPLE NEGATIVO

A nivel molecular este subtipo es catalogado como subtipo basal, ya que cuenta con características de las células epiteliales basales y mioepiteliales y corresponde al 15-20% de los tumores de cáncer de mama. En los ensayos de microarreglos de expresión se determinó que el subtipo triple negativo, presenta una nula expresión de los RE, RP y HER2, una gran expresión de citoqueratinas de alto peso molecular (5,6,17), así como P-caderina, Caveolina 1 y 2. Además de presentar mutaciones en *TP53*, un grado histológico alto y sobreexpresión de genes asociados con la proliferación celular. Por inmunohistoquímica es posible identificar al subtipo basal por una nula tinción a los RE, RP y HER2 por lo cual es comúnmente nombrado “triple negativo”, sin embargo, no todos los tumores triples negativo (cerca del 10%)

son subtipo basal, por lo cual se utilizan también la tinción de citoqueratina 5/6 y EGFR, aunque no es una práctica común en la clínica¹⁶. A diferencia del resto de los subtipos moleculares este tiene pobre pronóstico debido a falta de opciones terapéuticas y a la alta agresividad tumoral. Por no presentar expresión de receptores hormonales ni de HER2, los pacientes no se benefician con los tratamientos dirigidos, pero debido a su alta tasa de proliferación inicialmente muestra una alta sensibilidad a quimioterapia empero rápidamente presentan resistencia. En comparación al resto de los subtipos moleculares, este subtipo es muy atractivo en la rama de investigación ya que no se cuenta con blancos terapéuticos efectivos como opción para las pacientes afectadas con este tipo de tumores ^{17,18}.

1.5 VIAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LAS BIOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el resultado de una serie de mutaciones acumuladas en el DNA, cambios epigenéticos y eventos de cromotripsis en células diferenciadas del alveolo mamario, pero también en células troncales ¹⁹. Estos fenómenos afectan y activan una serie de vías de señalización, las cuales son responsables de la proliferación, el metabolismo intermedio, la migración, la invasión, la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis entre otros ²⁰.

Dentro de las vías de señalización afectadas en el cáncer de mama tenemos: la vía de señalización activada por estrógenos, las vías activadas por la familia de receptor a EGF, vía de PI3K/AKT/mTOR, la vía de las MAPK, la vía RB-E2F y p53, las vías angiogénicas, la vía Src, la vía de proteínas de choque térmico, las vías de reparación del DNA, la vía JAK/STAT, y las vías inmunogénicas ^{21,22} (Figura 6).

Aunque todas estas vías de señalización participan en el proceso de oncogénesis, la vía activada por la familia del receptor a EGF ha tomado mucha relevancia debido a que participa en la progresión de varios tumores como próstata y colón, además de que más del 25% de los tumores de cáncer de mama presentan una hiperactividad, mutaciones o amplificaciones del gen *ERBB2* que codifica para el receptor HER2 ²³.

1.5.1 FAMILIA EGFR/ HER

La familia de receptores HER cuenta con 4 miembros: EGFR (HER1), HER2, HER3 y HER4 ²⁴. Estos receptores pertenecen a la subclase I de receptores con actividad de tirosina cinasa intrínseco (RTKs), habitualmente estos receptores forman dímeros entre los diferentes miembros activando vías de señalizaciones diferenciales, dentro de su estructura estos cuentan con una región extracelular con un dominio de unión a ligando, un segmento transmembranal, un dominio con actividad de tirosincinasa y una cola intracelular con diversos sitios de fosforilación que regulan la señalización río abajo ²⁵. La región extracelular cuenta con 4 dominios los cuales permiten la unión con diferentes ligandos, algunos son receptor específico como EGF, TGF- α , AR y epigen y otros tienen más de un blanco de unión

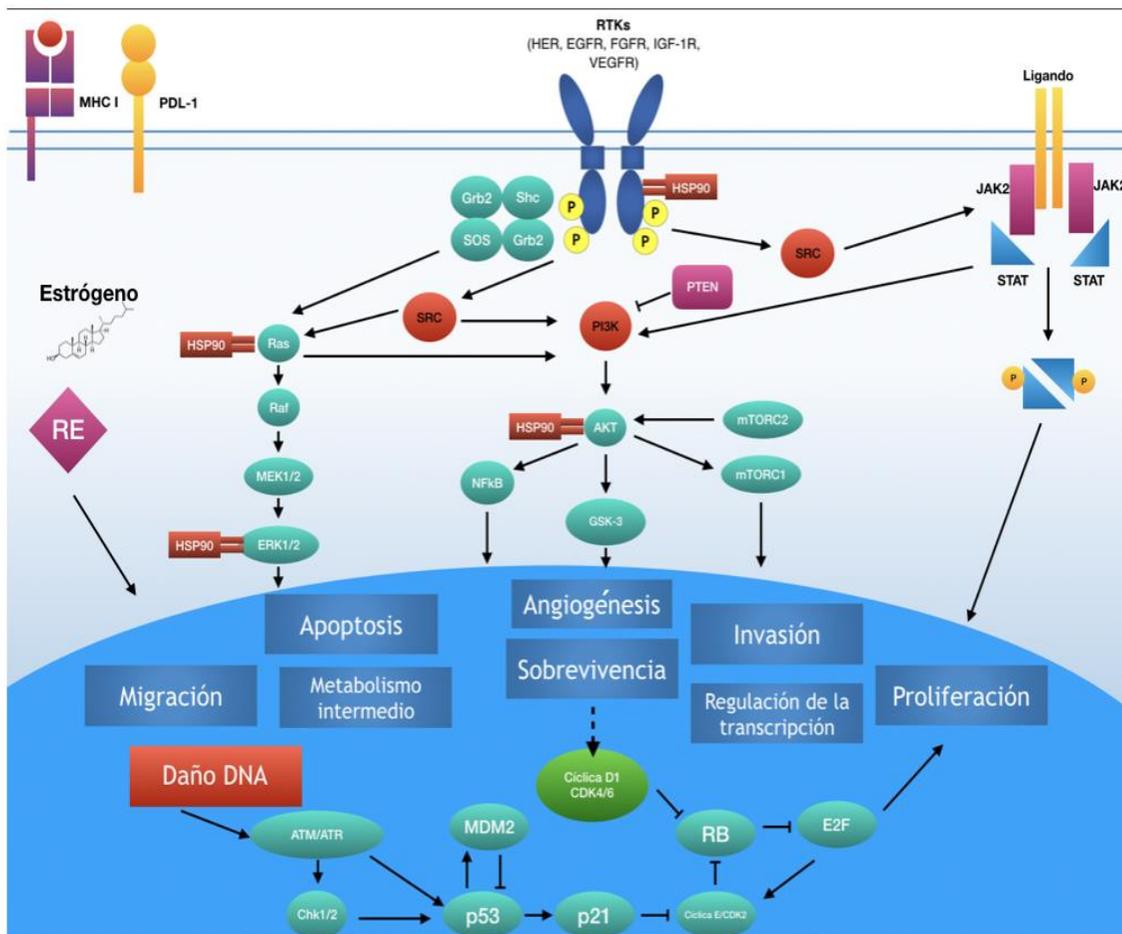


Figura 6. Vías de señalización involucradas en la carcinogénesis del cáncer de mama. Modificado de Cortesi, 2017 ⁸.

como las neuroregulinas, epiregulinas y betacelulina ²⁶. Sin embargo en el caso de la homodimerización de HER2 este ha sido catalogado como un receptor huérfano ya que hasta la fecha no se ha reportado ningún ligando conocido, una característica relevante de este receptor es que su estado conformacional mimetiza una estructura terciaria activada como el observado en otros miembros de la familia cuando se les une su ligando, esta característica permite que la dimerización HER2 por si sola sea capaz de activar diversas vías de señalización celular ^{27,28}. Una vez activados estos receptores desencadenan diversas cascadas de señalización, entre las más relevantes encontramos la vía Ras/RAF/MEK, ERK mejor conocida como la vía clásica de las MAP cinasas y PI3K/Akt/mTOR, conocidas por afectar procesos biológicos como la proliferación, el metabolismo intermedio, la angiogénesis, la supervivencia, la migración y la invasión celular ^{29, 30} (Figura 7).

1.6 TRATAMIENTOS ACTUALES EN EL CÁNCER DE MAMA

El amplio conocimiento de las diversas vías de señalización involucradas en el inicio y/o progresión del cáncer de mama ha permitido el desarrollo de terapias dirigidas capaces de identificar y atacar subtipos celulares específicos, minimizando el daño a células no transformadas como ocurre con la quimioterapia y la radioterapia ^{31,32}. En la mayoría de las clínicas y hospitales no se realiza de manera rutinaria la determinación de los subtipos moleculares por análisis genéticos, sin embargo, cada vez son más los hospitales que utilizan la inmunohistoquímica para caracterizar al cáncer de mama y de esta forma dirigir los tratamientos. Debido a que cerca del 60-70% de los tumores expresan receptores hormonales (RP, RE o ambos), la terapia endocrina es considerada como el estándar de oro y cuya sensibilidad al tratamiento correlaciona con el grado de positividad al receptor ³³. La terapia endocrina tiene como objetivo bloquear, competir o antagonizar la vía de señalización de estrógenos. Entre los fármacos utilizados se encuentra el tamoxifeno, el fulvestrant y el toremifeno cuyo mecanismo de acción es la competencia por el RE, estos fármacos son conocidos como moduladores selectivos del RE (MSRE) ya que tiene un efecto inhibitorio selectivo sobre el tejido mamario, pero actúa como estrógeno sobre otros órganos como hueso o útero ³⁴.

Por otra parte, pensando en los mecanismos de taquifilaxia y escape de competencia, se han desarrollado fármacos que bloquean la biosíntesis de estrógeno, durante este proceso los andrógenos son aromatizados para ser modificados a los diferentes estrógenos, la enzima encargada de catalizar esta reacción es la aromatasa, bajo este principio se desarrollo el anastrozol un inhibidor no competitivo reversible potente de la aromatasa ³⁵. Finalmente, se han desarrollo

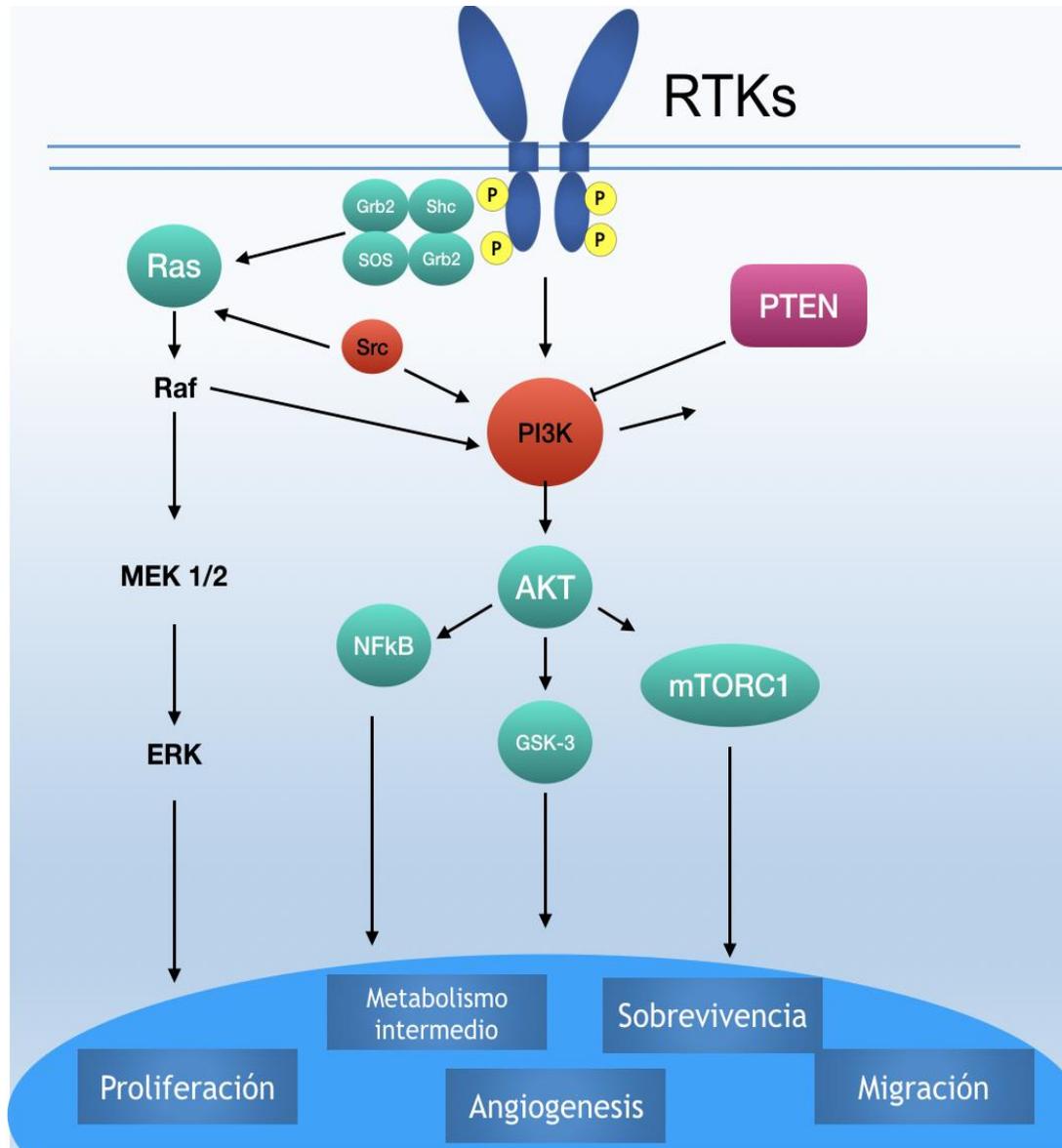


Figura 7. Vías de señalización clásicas activadas por RTKs. Modificado de Yixiao Feng, 2018 ³⁰.

fármacos dirigidos hacia el centro de regulación hormonal (Hipotálamo-Hipófisis-Ovario) inhibiendo el efecto pulsátil de la GnRH hipotálmica, y de esta forma se anula la producción de estrógenos. Estos fármacos son agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (también llamados análogos de LHRH o agonistas de GnRH) como el Goserelin y la Triptorelina ³⁶. Para los tumores del subtipo HER2 al presentar una sobreexpresión de este receptor, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que bloquean la actividad de este receptor, el primer fármaco que se desarrolló fue el Trastuzumab el cual se une al dominio IV de la región extracelular del receptor, provocando los siguientes efectos: Inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT, atenuación de la señalización por este receptor, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos e inhibición de la angiogénesis tumoral. Otro anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2 con mejores resultados clínicos es el Pertuzumab, el cual está dirigido contra el dominio II de la región extracelular del receptor, impidiendo no solo la homodimerización si no también la heterodimerización con otros miembros de la familia HER ^{37,38}. Para el caso del subtipo triple negativo actualmente no se cuenta con un tratamiento dirigido de uso cotidiano en la clínica, sin embargo, ya se han propuesto diversos fármacos que podrían ser útiles como el Sunitinib (inhibidor de RTKs), inhibidores de PARP, inhibidores de EGFR, Bevacizumab (Anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGF) y tratamientos clásicos como las antraciclinas, los taxanos y agentes de platino (carboplatino, cisplatino) ^{39,40} (Figura 8).

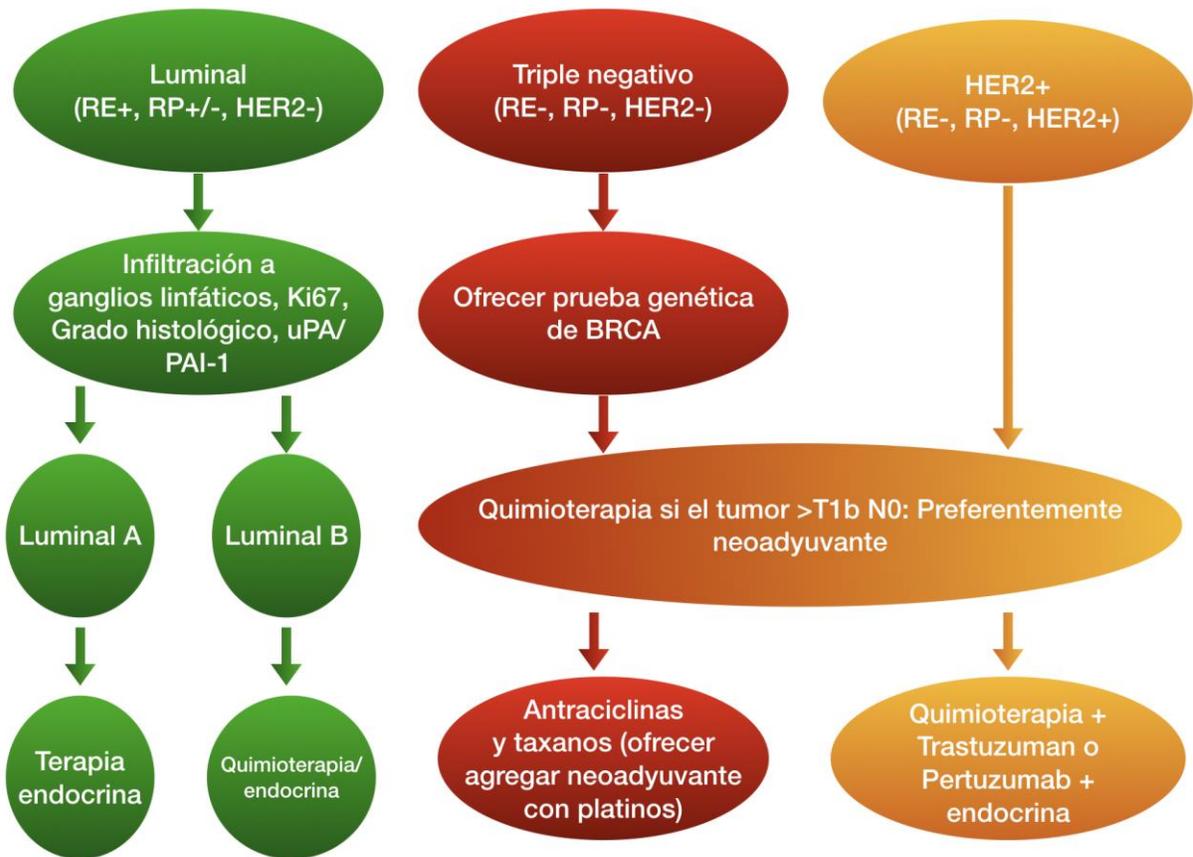


Figura 8. Tratamientos dirigidos para los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama. Modificado de Harbeck, 2019 ⁴⁰.

1.6.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS DE CÁNCER DE MAMA

Aunque se han desarrollado múltiples estrategias terapéuticas contra el cáncer de mama, la resistencia a fármacos es un proceso común a pesar de las diversas modalidades de tratamientos aplicados. Aun cuando pareciera que los mecanismos

de resistencia son particulares para cada subtipo molecular, se ha observado que no es así, ya que un tumor puede desarrollar resistencia *de novo* a múltiples tratamientos, como los inhibidores de RTKs, la resistencia a la terapia endocrina, a la quimioterapia y a los anticuerpos monoclonales.

La terapia endocrina es efectiva para la mayoría de los subtipos luminales pero cerca del 20-30% de los casos generan resistencia, entre los mecanismos de resistencia reportados, se encuentran las mutaciones puntuales *de novo* del gen *ESR1* que codifica para el RE, por ejemplo D538G o Y537S/C/N que disminuyen la afinidad del tamoxifeno al RE además estas mutaciones incrementan la proliferación y progresión tumoral en ausencia de ligando ^{41,42,43}. Otro mecanismo desarrollado por las células tumorales es la modificación del proceso enzimático de oxidación por citocromos citoplásmicos los cuales disminuyen la concentración de la forma activa del tamoxifeno (4-OH Tamoxifeno), lo cual impide su asociación con el receptor de estrógenos (Figura 9) ^{44,45}. En el caso de los subtipos luminal B y HER2+ donde el uso de anticuerpos monoclonales induce una respuesta inmune y posterior apoptosis, cerca del 70% de los pacientes presenta resistencia a este tipo de tratamientos, al menos dos mecanismos se presentan en la mayoría de estos pacientes: 1) el corte enzimático y 2) el enmascaramiento del epítipo ⁴⁶. En el corte enzimático las proteasas matriptasa, hepsina y prostasina cortan el dominio extracelular del receptor HER2, impidiendo que el anticuerpo monoclonal inhiba la función transductora. En el enmascaramiento de epítipo se han descrito dos proteínas (MUC4 y CD44/hialuronato) que se unen a la región de reconocimiento del Trastuzumab, impidiendo el bloqueo de la señalización de este receptor ⁴⁷. Finalmente, para el caso de los taxanos, antraciclinas y otros agentes quimioterapéuticos el principal mecanismo de resistencia es la sobreexpresión de las bombas ABC, que aumentan el flujo de salida de estas drogas ⁴⁸. Finalmente se han reportado múltiples mecanismos compensatorios del bloqueo de vías de

señalización clásicas, como la hiperactividad de la vía Ras/Raf/MEK/ERK y la vía PI3K/AKT/mTOR, reguladas positivamente por la familia de las cinasas Pak ⁴⁹.

1.7 FAMILIA DE CINASAS PAK

Las proteínas de cinasas activadas por p21 (Pak) son una familia de 6 cinasas que fosforilan serinas y treoninas, descritas en 1994 como homologas de las cinasas de

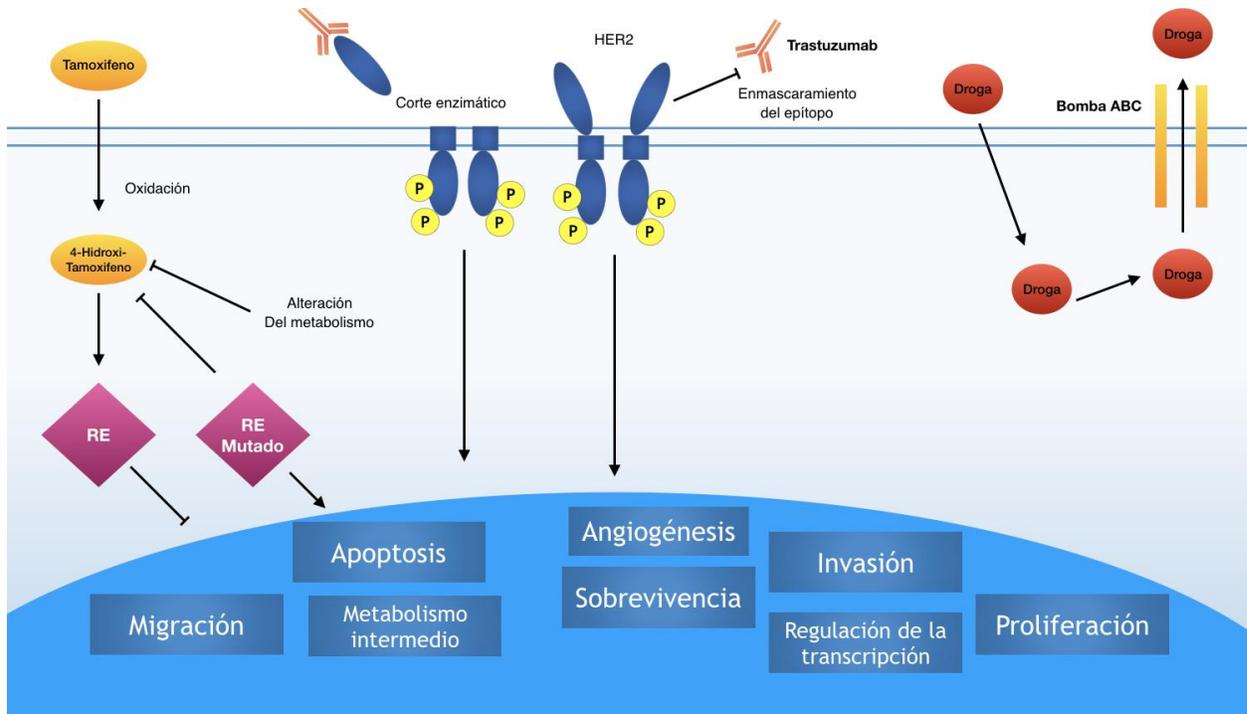


Figura 9. Mecanismos de resistencia a los tratamientos en cáncer de mama. Modificado de Wang, 2016 ⁴¹.

la familia Ste20p en *Saccharomyces cerevisiae* ⁵⁰. Estas cinasas participan en diversos procesos celulares como uniones célula-célula, adhesiones focales, ciclo celular, regulación del citoesqueleto, morfología celular, regulación de la transcripción génica, motilidad, invasión, angiogénesis, reparación del DNA, sensibilidad hormonal, y regulación de la dinámica de las fibras de actina y microtúbulos ^{51,52,53}. Los seis miembros de la familia Pak se dividen en dos grupos de acuerdo con su estructura química y a la similitud en sus secuencias: el grupo I

cuenta con Pak1, Pak2 y Pak3 y el grupo II consta de Pak4, Pak5 y Pak6 (Figura 10) ⁵⁴.

1.7.1 ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA FAMILIA PAK

Las Paks del grupo I cuentan con un dominio SH3 en su extremo NH-terminal, al que se une la proteína Nck que le permite regular su actividad de proteína de andamiaje lo que le facilita su dinámica molecular compartimentos celulares, posteriormente cuentan con un dominio de interacción con Cdc42/Rac1 (CRIB), el cual sobrelapa con un dominio de autoinhibición (AID) que permite su regulación, estas se activan mediante la unión de las formas activas (unidas a GTP) de GTPasas de la familia Rho (Cdc42 y Rac1), además cuenta con dominios ricos en prolina que le permiten la interacción con diversos complejos proteicos, un sitio de unión a β PIX (*Pak interacting Exchange factor*) que permite que β PIX se una a las Paks y posteriormente active a Rac1 o Cdc42 a través de su actividad GEF, lo que promueve una vía de transducción eficiente. También, recientemente se ha descrito



Figura 10. Representación esquemática de los miembros de la familia de cinasas Pak. Modificado de Zhang 2020 ⁵⁹.

una secuencia de localización nuclear que les permite translocarse al núcleo donde fosforilan algunas proteínas nucleares y forman parte de complejos

transcripcionales y finalmente un dominio de cinasa de serina treonina en el extremo carboxilo-terminal (Figura 10) ^{55,56,57,58,59}.

Las PAK del grupo II son muy similares a las del grupo I pero no cuentan con dominios de autoinhibición y no son activados por GTPasas de la familia Rho, sin embargo, tienen una secuencia de pseudosustrato similar a un dominio de autoinhibición que inactiva el dominio de cinasa al unirse al dominio CRIB unido a Cdc42, a su vez este dominio de pseudosustrato se une a motivos SH3 que le permite la liberación del dominio catalítico, estimulando la actividad de cinasa (Figura 10) ⁶⁰.

Todas las cinasas de la familia Pak cuentan con un dominio catalítico altamente conservado en el extremo carboxilo-terminal, en el caso de las Paks del grupo I se encuentran en una conformación inactiva como homodímeros antiparalelos, su actividad es regulada mediante un mecanismo de autoinhibición en *trans*, donde el dominio CRIB que se superpone con el dominio AID se une al dominio catalítico de su monómero adyacente. La unión de las GTPasas Rac1 o Cdc42 al dominio CRIB o la unión de fosfatidilinositol liberan el dominio AID del dominio de cinasa, reorganizando la estructura y una primera autofosforilación en la S144, después en la S199/204 y finalmente una autofosforilación en *trans* en la T423 ⁶¹. Posteriormente cuando el dominio de cinasa esta autofosforilado y se une a su primer sustrato, adopta una conformación monomérica y las autofosforilaciones posteriores estabilizan el estado activo (Figura 11a).

En lo que respecta a las cinasas del grupo II, cada vez se conoce más sobre los diversos mecanismos de activación de estas cinasas (Figura 11b-c), ya que se pensaba que estas se encontraban constitutivamente activas. Las Paks del grupo II se encuentran en forma monomérica y su activación depende de cambios conformacionales, la unión de Cdc42 al dominio CRIB libera el dominio catalítico del dominio AID permitiendo su activación (Figura 11b). Un segundo modelo propone que Pak4 es inhibido por la unión del dominio de cinasa con un motivo de

pseudosubstrato, la unión de proteínas con dominios SH3 al pseudosubstrato separan esta unión permitiendo la actividad de cinasa (Figura 11c) ⁶².

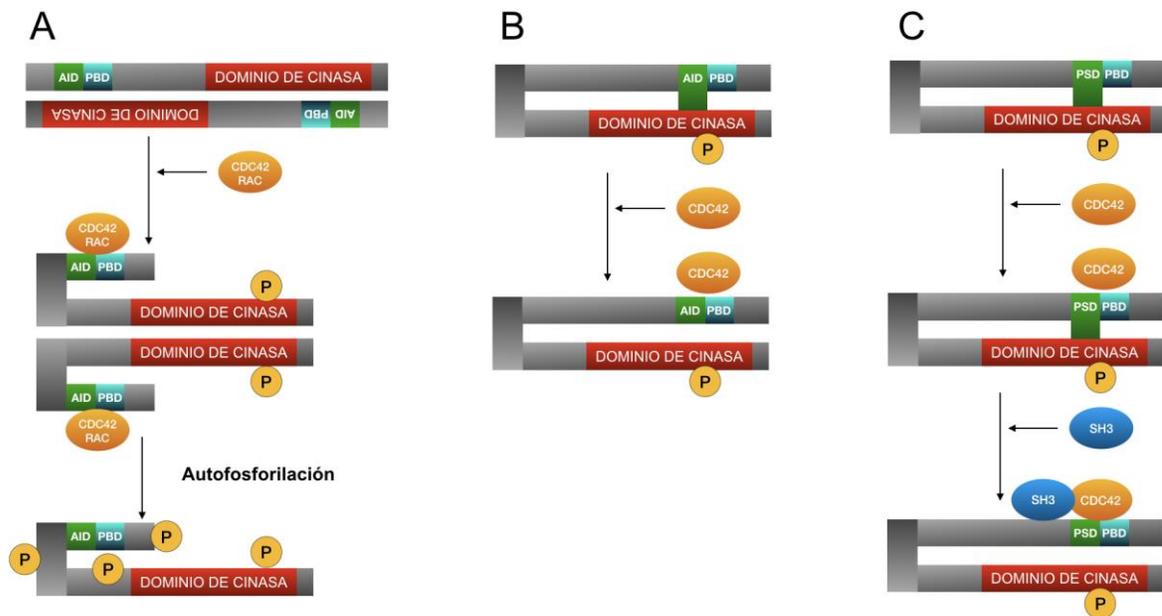


Figura 11. Mecanismo de activación de las cinasas Pak. Modificado de Kumar, 2016. ⁵⁹

1.7.2 BIOLOGÍA DE LAS CINASAS PAK

Desde su descubrimiento, el estudio de las cinasas Pak sobre la biología celular ha sido fascinante, se ha reportado su participación en diversas funciones biológicas a través de la fosforilación directa o indirecta de diversos sustratos que participan en la remodelación del citoesqueleto, en regular la transcripción, en la progresión del ciclo celular, en la reparación del daño al DNA, en los procesos neurológicos y cardiacos y finalmente su papel en el desarrollo de cáncer (Figura 12) ⁵⁴.

1.7.2.1 PAKS Y REMODELACIÓN DEL CITOESQUELETO

La remodelación del citoesqueleto por las cinasas Pak se debe a su papel en la regulación de la nucleación y polimerización de los filamentos de actina, contracción del complejo actina/miosina, la formación de lamelipodios y filopodios, la polaridad celular, la citocinesis etc ⁶³. Las Paks realizan todas estas funciones a través de su

Grupo I Grupo II

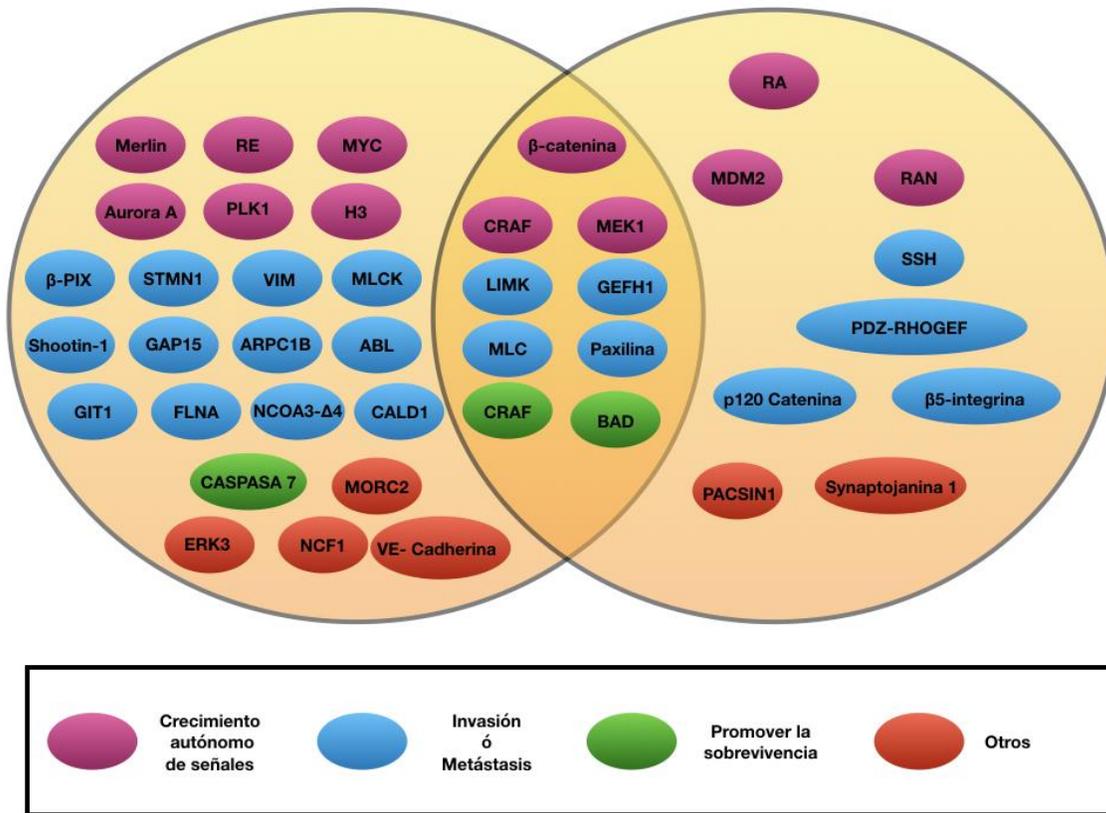


Figura 12. Sustratos de las cinasas Pak validados y su papel en los procesos biológicos del cáncer. Modificado de Radu, 2013⁶³.

actividad de cinasa y/o por funcionar como una proteína de andamiaje⁶⁴. Por ejemplo, Pak1 fosforila a Arpc1b en la T21 estabilizando la actividad de nucleación del complejo Arp2/3, y en el caso de la regulación de la polimerización de la actina lo hace a través de la fosforilación de LIMK la cual fosforila a la Cofilina en la serina 3 inhibiendo su actividad⁶⁵. En la formación de lamelipodios y filopodios Pak1 dirige el complejo WAVE2-kinesina hacia los extremos de los microtúbulos mediante la fosforilación y reclutamiento del complejo estatmina/oncoproteína18 a la tubulina naciente⁶⁶. Para el proceso de la citocinesis Pak1 regula la localización de Mid1 y

Cdc15 hacia el anillo de citocinesis, además fosforila a la proteína de unión a RNA Sts5 previniendo la formación de gránulos ⁶⁶.

1.7.2.2 PAKS Y FUNCIONES NUCLEARES

Pak1 cuenta con 3 secuencias de localización nuclear funcionales en su extremo amino-terminal, lo que le permite su translocación al núcleo celular jugando un papel importante en la regulación de la transcripción y eventos mitóticos ⁶⁷. Una vez en núcleo Pak1 está involucrado en la regulación de la transcripción a través de su interacción indirecta con promotores y/o reguladores de la transcripción, ya que se han identificado varios factores de transcripción y correguladores transcripcionales como sustratos que interactúan con Pak1, incluido el factor de transcripción forkhead (FKHR), RE α , y *snail*. Pak 1 también modula la expresión de genes por unirse a los “*enhancers*” o represores y promotores de los genes *PFK-M* y *NFAT1* estimulando la expresión de *PFK-M* pero reprimiendo la expresión de *NFAT* ⁶⁸. Sin embargo, el papel biológico de este proceso no es claro. Actualmente se han reportado una gran cantidad de sustratos nucleares de las cinasas Pak que

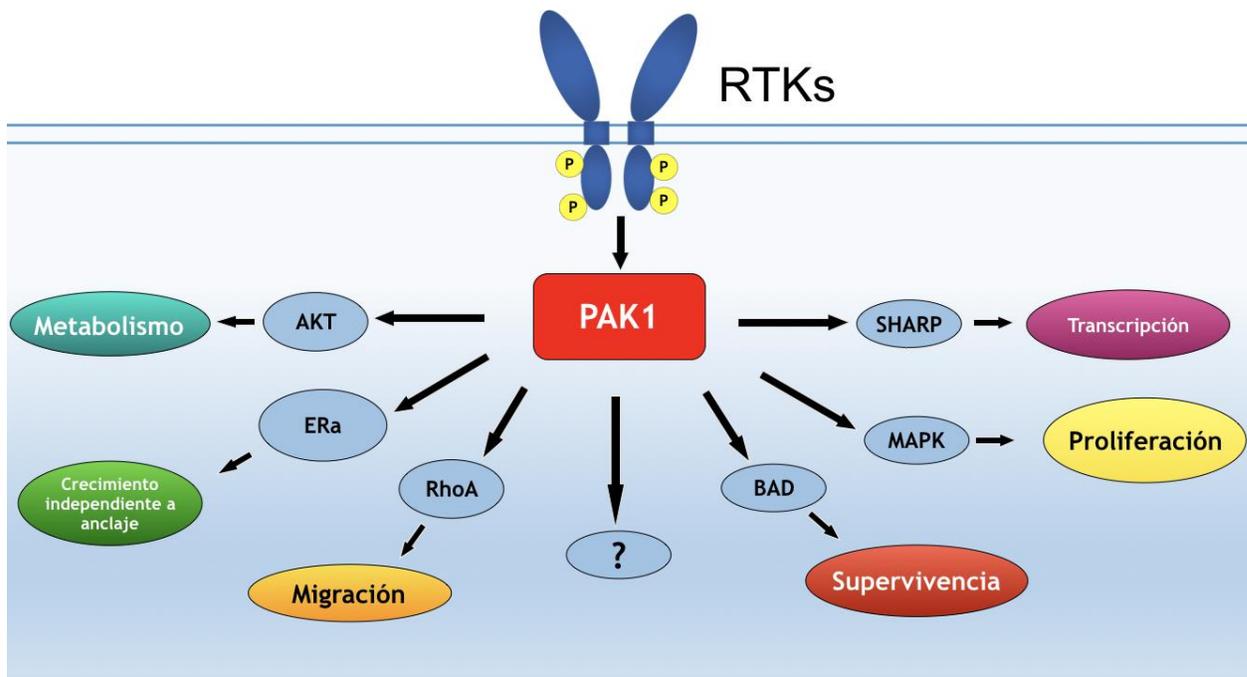


Figura 13. Procesos celulares afectados por Pak1.

participan en la biogénesis de RNA no codificantes, replicación del DNA, modulación de la transcripción, dinámica de exporte e importe de proteínas nucleares etc. ^{69,70}

1.7.2.3 PAKS Y PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

El ciclo celular es regulado por las cinasas dependientes de ciclinas, cinasas Aurora y las cinasas *Polo like*. Todas ellas reguladas directa o indirectamente por Pak1. Iniciando con Aurora A, esta es fosforilada en la T288 y la S342 promoviendo la maduración del centrosoma, la organización y la formación del polo y del huso mitótico estimulando de esta forma la mitosis. Debido a esto la inhibición farmacológica combinada en cáncer de mama inhibió el crecimiento y la señalización conducida por RE en un modelo de xenoinjerto. Además, Pak1 fosforila al cofactor de tubulina B (TCoB) en la S65 y S128, permitiendo la interacción con la tubulina nuclear lo que promueve la polimerización de los microtúbulos durante la mitosis, en contraparte Pak1 también fosforila a la cinesina mitótica asociada al centrómero (MCAK) en la S111 y S192 regulando la despolimerización de los microtúbulos, por lo que este efecto dual refleja la dinámica mitótica de Pak1. Durante la condensación de los cromosomas Pak1 fosforila al dímero de histonas H3.3A/H3 en la S10 promoviendo la división celular, a su vez Pak2 participa en la replicación del DNA al fosforilar a la histona H4 en la S47. Por último, Pak1 regula indirectamente a *MYC* que a su vez puede controlar varias cinasas dependientes de ciclinas (CDK4/6, ciclina D, CDK2 y ciclina E) para promover la progresión del ciclo celular ^{71,72,73,74,75}.

1.7.2.4 PAKS Y REPARACIÓN DEL DAÑO AL DNA

Recientemente se ha demostrado la participación de las cinasas Paks en la reparación del daño al DNA, sin embargo, el mecanismo molecular de cómo estas cinasas participan en este proceso no es claro, algunos estudios han observado que la sobreexpresión de Pak1 se correlaciona con un aumento en la expresión de los genes implicados en la reparación del DNA y en la estabilidad genómica. Esto se debe a que Pak1 fosforila a NF- κ B, lo que permite la translocación nuclear de la subunidad p65 en donde actúa como factor de transcripción que se une a los

promotores de los genes de Fanconi los cuales son esenciales para los procesos de reparación del daño al DNA por recombinación homóloga. En presencia de daño al DNA Pak1 fosforila a MORC2 en la S739 facilitando la remodelación de la cromatina y su posterior reparación. La fosforilación de Raf en S338 por PAK1 activa a la cinasa de punto de control del ciclo celular 2 (CHK2) para regular la respuesta al daño del ADN, lo que contribuye a la sobrevivencia de las células tumorales. Además, Pak1 puede afectar el ciclo celular al regular los cambios dinámicos de los cromosomas ^{76,77,78,79}.

1.7.3 PAK Y CÁNCER

Tomando en cuenta todos los procesos biológicos en los que participan las cinasas Paks, es comprensible entender porque están involucradas en la biología del cáncer. Las cinasas Paks se encuentran sobreexpresadas y/o hiperactivas en diversos tumores humanos como cáncer de ovario, de pulmón, vejiga, cerebro, cáncer colorectal y mama ⁸⁰. En este último la cinasa Pak1 se encuentra sobreexpresada y/o hiperactiva en más del 50% de los tumores independientemente del subtipo molecular al que pertenezca. Hasta la fecha, son diversos los mecanismos propuestos que explican esta sobreexpresión/hiperactividad entre las que se encuentran la presencia del amplicón *11q13-14* donde se encuentra el gen *PAK1*, mutaciones activadoras de efectores ríos arriba como Rac1, o recientemente se ha identificado que la sobreexpresión de Pak1 se debe a una disminuida expresión del microRNA miR-7 que tiene como blanco al mRNA de Pak1 ^{81,82,83}.

Los niveles de expresión de Pak1 se correlacionan positivamente con un mal pronóstico en cáncer de mama, presencia de metástasis y con resistencia a terapia endocrina. Los cultivos tridimensionales de células epiteliales mamarias que expresan ectópicamente al receptor HER2 (MCF10A.ERBB2) con activación inducible forman acinos multilobulares semejantes a los observados en carcinoma ductales mientras que, en el mismo modelo, pero en ausencia de Pak1 resulta en una arquitectura acinar normal ⁸⁴. También se encontró que en un modelo murino la expresión ectópica de una forma constitutivamente activa de Pak1 que se

encuentra bajo el control del promotor de β -lactoglobulina (promotor específico del epitelio mamario) induce la formación de tumores debido a la hiperactividad de diversas vías de señalización activadas por RTKs confirmando que Pak1 es sumamente importante en la activación completa de la vía Ras/RAF/MEK/ERK, la vía PI3K/AKT/mTOR, vía de estrógenos, Bcl2/BAD, RhoA/ROCK las cuales controlan procesos celulares como progresión del ciclo celular, sobrevivencia, proliferación, metabolismo, migración e invasión explicando parcialmente el proceso de transformación celular (Figura 13) ^{85,86,87}. Sin embargo, no se conocen todos los sustratos que pueden ser fosforilados directa o indirectamente por Pak1 y que expliquen la activación de todas estas vías oncogénicas. Bajo este criterio el grupo de Chernoff y colaboradores en el 2013 realizaron un microarreglo de fosfoanticuerpos utilizando lisados proteicos de células MCF10A.ERBB2 en ausencia y en presencia de Pak1 (Figura 14) con el objetivo de encontrar posibles nuevos sustratos de Pak1. Este experimento permitió identificar sustratos directos

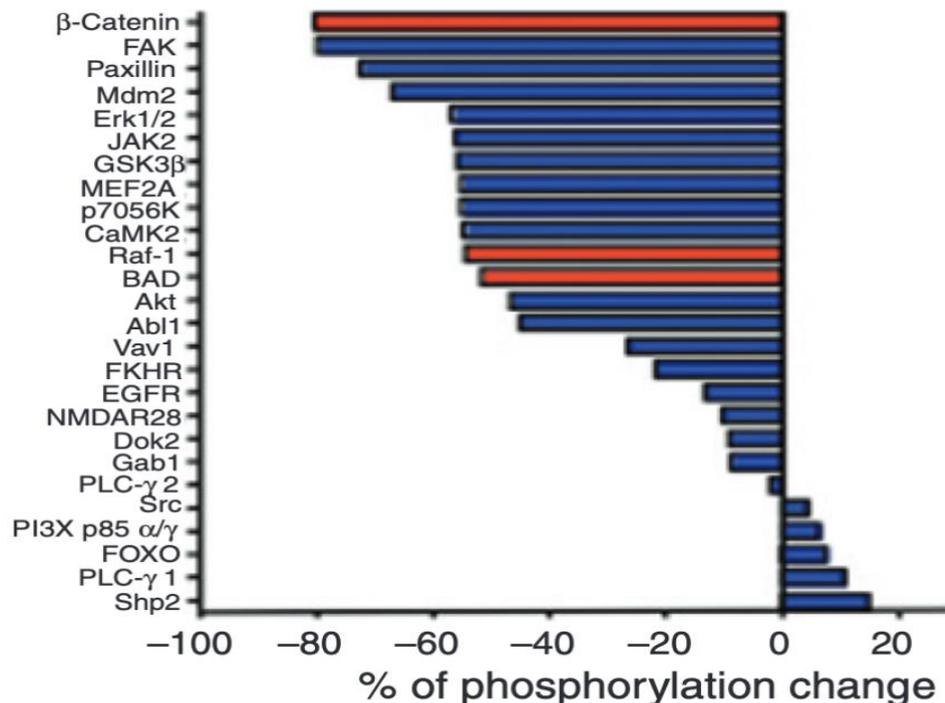


Figura 14. Microarreglo de fosfoanticuerpos que muestra proteínas hipofosforiladas en ausencia de Pak1. Tomado de Chernoff, 2013 ⁸⁸.

e indirectos conocidos para Pak1 como ERK, RAF, BAD y Akt, los cuales presentaron bajos niveles de fosforilación en ausencia de Pak1. Interesantemente, en este mismo trabajo se encontró que la cinasa dependiente de calcio calmodulina (CaMKII), mostró una gran pérdida de fosforilación, sugiriendo que podría ser un nuevo blanco de fosforilación por Pak1 ⁸⁸.

1.8 CINASA DEPENDIENTE DE CALCIO/CALMODULINA

La familia de cinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKII) son enzimas con la capacidad de fosforilar residuos de serinas y treoninas, está se dividen en dos clases de acuerdo con la especificidad de su sustrato ⁸⁹. Las CaMK de tipo 1 son monosustrato e incluye a CaMKIII y las de tipo 2 son multifuncionales e incluyen a CaMKI, CaMKII y CaMKIV. Esta familia de cinasas participa en la progresión del ciclo celular, el reordenamiento del citoesqueleto, mecanismos neurológicos como aprendizaje y memoria, motilidad celular, y contracción muscular entre otros. De entre todos los miembros de la familia CaMK, CaMKII ha sido de gran interés en el campo de las neurociencias al participar en plasticidad neuronal, liberación de neurotransmisores, memoria a largo plazo y recientemente se ha asociado al desarrollo de cáncer ^{90,91}.

1.8.1 ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LAS CAMKII

Las cinasas CaMKII cuentan con un dominio catalítico en el extremo amino-terminal seguido de un dominio de regulación que se subdivide en un subdominio de autoinhibición y un subdominio de unión de calcio/calmodulina. Mientras que en el extremo carboxilo-terminal presenta un dominio de asociación que le permite la multimerización entre 12 y 14 subunidades con estructura de rueda. Las cinasas CaMKII, se encuentran en una forma inactiva, ya que el subdominio de autoinhibición funciona como un pseudosustrato el cual se enlaza al dominio de cinasa, bloqueando su capacidad de fosforilar. Cuando los niveles de calcio intracelular aumentan estos se unen a la calmodulina, el complejo calcio calmodulina se une al subdominio de unión a calmodulina, liberando y activando el dominio de cinasa, el cual lleva a cabo una autofosforilación en *trans* del monómero adyacente en la T287 que se encuentra en el dominio de regulación, esta

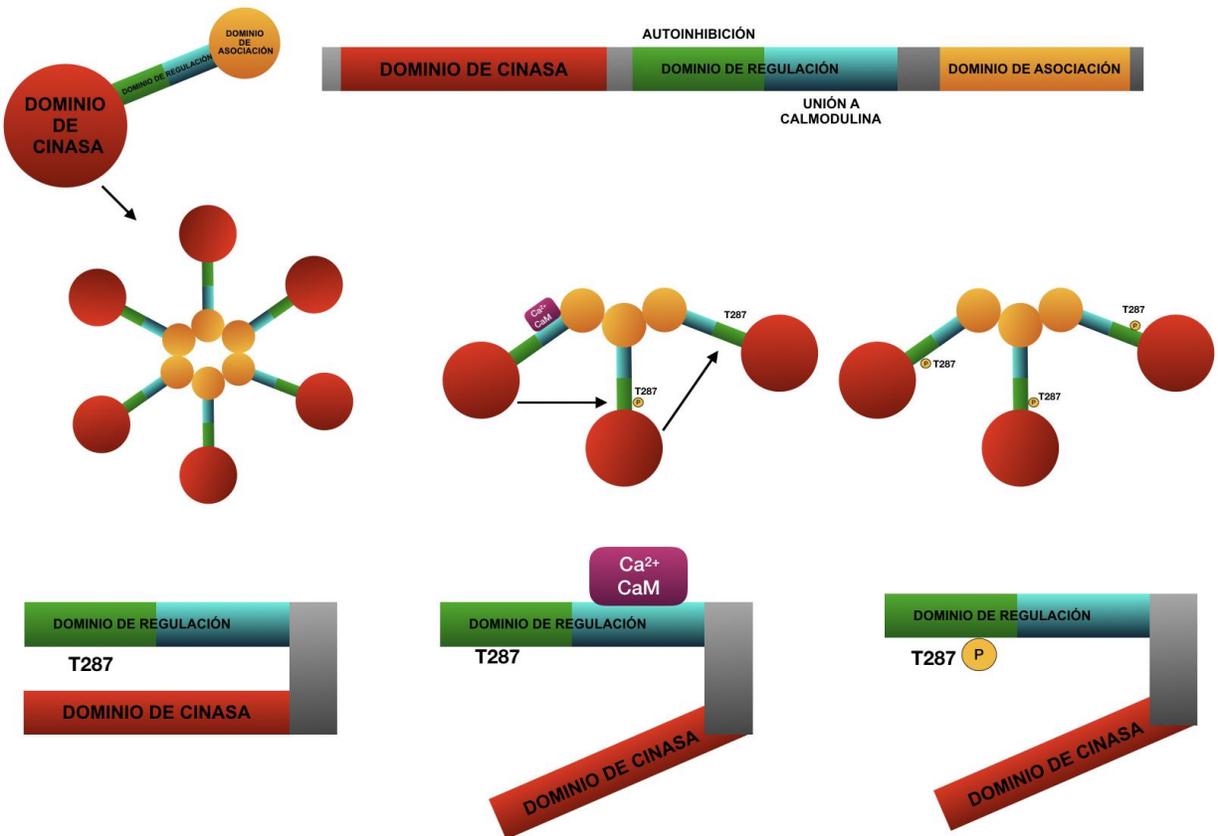


Figura 15. Estructura y mecanismo de activación de CaMKII. Modificado de Anderson 2011⁹⁰.

fosforilación tiene tres efectos: 1) incrementa más de mil veces la afinidad del complejo calcio/calmodulina al dominio de regulación, 2) bloquea la reasociación del dominio catalítico al subdominio de autoinhibición y 3) genera un efecto dominó al desencadenar una autoactivación de la holoenzima aún en ausencia de calcio a lo que se conoce como memoria molecular. Posteriormente la T287 es desfosforilada por la fosfatasa PP1, causando la inactivación de CaMKII (Figura 15)⁹²⁹³.

1.8.2 CAMKII Y CÁNCER

CaMKII ha tomado importancia por estar sobreexpresada en diversos tipos de cáncer como: pulmón, próstata, colón y mama. Estudios recientes asocian a CaMKII en la progresión tumoral ya que regula procesos celulares como la proliferación y ciclo celular, migración e invasión, apoptosis, sobrevivencia y regulación de la

transcripción (Figura 16) ⁹⁴. Durante la proliferación tumoral CaMKII activa la vía de las MAPK, la vía de Stat3/Stat5, la vía GSK3 β / β -catenina, y la vía de NF- κ B a través de la fosforilación de diversos substratos como IKK β , Akt, ERK, Stat3 ⁹⁵. Además de que, algunos estudios han reportado una disminución del 80-70% en la tasa de proliferación en líneas celulares de osteosarcoma tratadas con KN93, el cual es un inhibidor farmacológico de CaMKII ⁹⁶. Por otro lado, CaMKII también participa activamente en la progresión del ciclo celular, promoviendo la transición de G1/S por incrementar la expresión de la ciclina D1 a través de la vía NF- κ B, por regular la transición S-G2/M por activar a MEK, y posterior fosforilación e inhibición de p27^{Kip1} ⁹⁷. Además de que, cada vez un número más evidencias experimentales sustentan el papel clave que CaMKII tiene en la migración e invasión, ya que el silenciamiento de CaMKII muestra una disminución en la motilidad e invasión en líneas celulares de osteosarcoma. ⁹⁶ De igual forma la sobreexpresión de CaMKII en líneas celulares

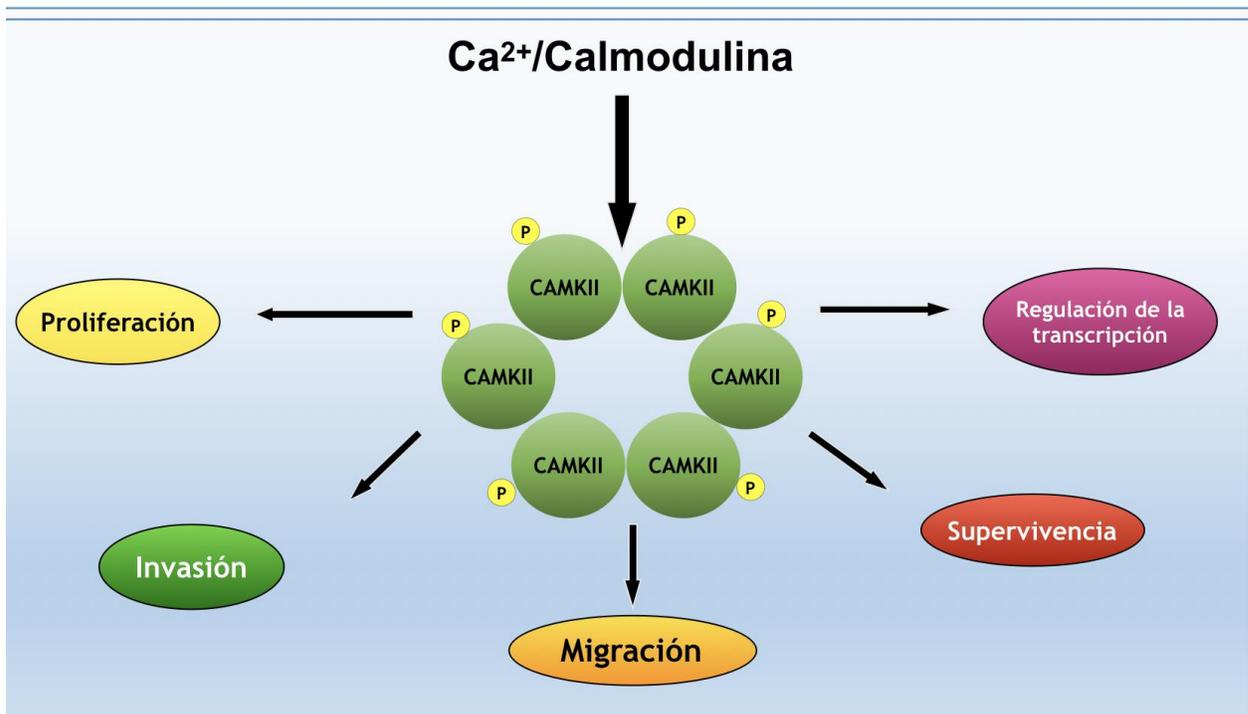


Figura 16. Vías de señalización activadas por CaMKII en cáncer.

de cáncer de próstata aumentó significativamente la tasa de motilidad celular ⁹⁸. En procesos de migración celular la actividad de CaMKII promueve la polimerización de actina y el crecimiento de neuritas de una manera dependiente de la GTPasa RhoA ^{99,100}. Finalmente, CaMKII regula vías anti-apoptóticas a través de la inhibición de la expresión de las pro-caspasas 7 y 8 ¹⁰¹. En los últimos años han aparecido fuertes evidencias que asocian a CaMKII en procesos celulares clave para la tumorigénesis como: la regulación de la proliferación celular, el ciclo celular, la migración, la invasión y la metástasis, procesos que también son regulados por la cinasa Pak1. Además, si tomamos en cuenta que el microarreglo de fosfoanticuerpos en ausencia de Pak1 mostró una hipofosforilación de CaMKII, proponemos la existencia de un posible eje de señalización Pak1/CaMKII en cáncer de mama que podría ser una nueva diana terapéutica cuya modulación presenta nuevas oportunidades para el tratamiento de este tipo de cáncer.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es el principal problema de salud pública en el mundo, siendo el cáncer de mama la causa número uno de mortalidad por neoplasias sólidas en mujeres mayores de 25 años. En México y Norteamérica el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad, su aparición y progresión está relacionado con aspectos demográficos, sociales y del medio ambiente donde los estilos de vida poco saludables toman mayor importancia sobre los aspectos genéticos. A diferencia de otros tumores, este cáncer tiene una alta capacidad de ser diagnosticado en etapas tempranas a través de la autodetección o por estudios de imagen relativamente simples, sin embargo, la falta de conocimiento, un nivel socioeconómico bajo, la falta de infraestructura y las falsas creencias asociadas a las pruebas diagnósticas generan que el diagnóstico se haga en etapas avanzadas con mal pronóstico para el paciente.

Una vez diagnosticado el tumor, es obligatorio llevar a cabo técnicas de inmunohistoquímica para conocer el fenotipo celular, esto debido a que desde el 2000 Perou y colaboradores ¹⁰² demostraron que el cáncer de mama al igual que otros tumores presentan diversos subtipos moleculares que aportan información pronóstica y asistencial en la selección de estrategias terapéuticas.

Cerca del 55% de los tumores de cáncer de mama presentan una sobreexpresión/hiperactividad de la cinasa activada por p21 1 (Pak1) la cual tiene funciones regulatorias sobre procesos de proliferación, migración, invasión, resistencia a drogas etc. Esto a través de la fosforilación directa o indirecta de sustratos asociados a procesos oncogénicos, una de las proteínas que participa junto con Pak1 en la tumorigenesis del epitelio mamario es CaMKII cuyos procesos celulares como migración, proliferación y apoptosis son compartidos con Pak1, esto abre la posibilidad de la existencia de un nuevo eje de señalización Pak1/CaMKII que podría ser fundamental para el crecimiento y diseminación tumoral. Por lo cual es necesario un estudio más detallado de los mecanismos moleculares a través de los cuales Pak1 y CaMKII contribuyen en la biología del cáncer de mama. El estudio de una nueva vía de señalización (Pak1/ CaMKII) nos permitirá saber si esta vía es

relevante en el control de los procesos celulares que se ven afectados durante la progresión del tumor como la proliferación, la migración y la invasión tumoral. Así como la identificación de esta vía como un nuevo blanco terapéutico en el cáncer de mama humano.

3. HIPÓTESIS

Existe una vía de señalización Pak1/CaMKII que está implicada en la biología del cáncer de mama y su inhibición farmacológica combinada es efectiva en el tratamiento del cáncer de mama humano.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la importancia de la vía de señalización Pak1/CaMKII en la biología del cáncer de mama, así como evaluar su potencial inhibición farmacológica combinada en el cáncer de mama humano.

4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar si CaMKII es un sustrato de Pak1 *in silico* y en un contexto celular
2. Establecer a nivel de proteína la expresión de Pak1 y CaMKII en líneas celulares de cáncer de mamá y en un cultivo primario derivado de una paciente mexicana.
3. Establecer si existe una asociación física entre Pak1 y CaMKII en un contexto celular.
4. Establecer si existe una correlación entre la expresión de Pak1 y CaMKII en biopsias de tejido de cáncer de mama humano.
5. Determinar el efecto de la inhibición farmacológica de Pak1/CaMKII en líneas celulares de cáncer de mamá y en un cultivo primario de una paciente mexicana.
6. Evaluar el efecto de la inhibición de Pak1 y CaMKII sobre los procesos biológicos del cáncer de mama como apoptosis, migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mamá y en un cultivo primario de una paciente mexicana.
7. Averiguar el efecto inhibitorio combinado de Pak1 y CaMKII en un modelo animal de cáncer de mama.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 LÍNEAS CELULARES

5.1.1 MCF-10A

La línea celular de epitelio mamario no transformado MCF-10A se cultivó en medio DMEM-F12 (GIBCO). Este medio se complementó con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1X de penicilina-estreptomicina 100X (10,000U/mL, BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada en una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.

5.1.2 MCF-7

La línea celular de cáncer de mama RE+, RP+ (Luminal) MCF-7 se cultivó en medio DMEM-F12 (GIBCO). Este medio se complementó con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1X de penicilina-estreptomicina 100X (10,000U/mL, BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada en una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.

5.1.3 SK-BR-3

La línea celular de cáncer de mama HER2+ SK-BR-3 se cultivó en medio McCoys 5A (GIBCO). Este medio se complementó con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1X de penicilina-estreptomicina 100X (10,000U/mL, BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada en una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.

5.1.4 MDA-MB-231

La línea celular de cáncer de mama triple negativo RE-, RP-, HER2- MDA-MB-231 se cultivó en medio DMEM (GIBCO). Este medio se complementó con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1X de penicilina-estreptomicina 100X (10,000U/mL, BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada en una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.

5.1.5 HEK-293T

La línea celular de riñón embrionario humano HEK293T se cultivó en medio DMEM (GIBCO). Este medio se complementó con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1X de penicilina-estreptomicina 100X (10,000U/mL, BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada en una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.

5.1.6 MBCDF-B4

El cultivo primario de cáncer de mama humano triple negativo RE-, RP-, HER2-MBCDF-B4 se cultivó en medio RPMI-1640 (GIBCO). Este medio se complementó con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1X de penicilina-estreptomicina 100X (10,000U/mL, BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada en una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire. Este cultivo primario de cáncer de mama fue donado por la Dra María de Jesús Ibarra-Sánchez ¹⁰³.

5.2 PLÁSMIDOS

Los vectores de expresión pCMV6M-Pak1 y uniRapR-Pak1 se describieron previamente ^{104,105}. El ORF de CaMKII se amplificó mediante PCR utilizando el vector pDONR223-CAMK2G como molde (plásmido Addgene nº 23409) y se clonó en los sitios de restricción HindIII y EcoRI del vector pEGFP-C1 (Clontech, # Catalogo 6084-1).

5.3 TRANSFECCIONES

Las células se sembraron en placas de seis pozos y se transfectaron transitoriamente con el vector de expresión uniRapR-Pak1 usando Lipofectamine 3000 (Invitrogen #L3000001) o siRNAs oligonucleótidos smartpool (10 nM) dirigidos contra el mensajero de Pak1 (Dharmacon UK #L-003521) usando RNAiMax (Invitrogen, #13778100) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas

después de las transfecciones se obtuvieron lisados celulares y se almacenaron a -20 °C.

5.4 MODELADO MOLECULAR

Se generó un modelo que pudiera mostrar la interacción de CaMKII γ y 2 péptidos derivados. La secuencia del primer péptido (secuencia: LKHPWVCQRSTIVASMMHRQET donde el subrayado T11, correspondiente a la T277, que fue identificado como un posible sitio de fosforilación y el cual se indica con la letra T en negritas) y el péptido II (secuencia: STVASMMHRQETVSLRKFNAR, donde la treonina 12 en negritas que corresponde a la T287 de CaMKII γ , que también se identificó como un posible residuo fosforilado. Con este modelo de acoplamiento y con ambos péptidos que contienen sitios de fosforilación decidimos realizar experimentos de acoplamiento péptido-proteína y proteína-proteína seguidos de simulaciones de dinámica molecular. Primero, se utilizó la plataforma en línea *PEPstrMOD*¹⁰⁶, para predecir la estructura de las secuencias de ambos péptidos, mientras que la estructura de CaMKII γ se obtuvo del *Protein Data Bank (PDB)*¹⁰⁷ con el código de acceso PDB ID: 2V7O¹⁰⁸. El dominio de cinasa Pak1 activo en complejo con la estructura de ATP que también se descargó del PDB con el código de acceso PDB ID: 3Q53¹⁰⁹. Para los experimentos de acoplamiento, se utilizó el servidor en línea *ClusPro*¹¹⁰. *ClusPro 2.0* genera conformaciones basadas en diferente desolvatación y potencial electrostático; esas conformaciones se clasifican mediante agrupamiento. En otras palabras, *ClusPro* agrupa las poses potenciales en grupos y luego ordena estos grupos considerando el número de miembros (poses) en cada uno. Un mayor número de miembros en el grupo sugiere que el grupo tiene una mayor probabilidad de formarse, incluso si no es el más estable. Para la simulación de acoplamiento proteína-proteína, se seleccionó la opción de atracción implementada en *ClusPro*¹¹¹ con los residuos T277 y T287 de CaMKII γ y los residuos R299 y D389 dentro del sitio de unión de ATP de la cinasa Pak1, ya que la evidencia experimental indica que Pak1 fosforila esos residuos de treonina. Se generaron varios modelos con distribución de conglomerados similar. Seleccionamos aquellos en los que T277 de

CaMKII γ estaba más cerca de ATP y otro modelo en el que T287 era el residuo más cercano. Los modelos estructurales de los complejos se visualizaron utilizando *UCSF Chimera*, con diferentes colores aplicados para etiquetar cada proteína para facilitar la visualización y la interpretación.

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo por duplicado usando *Yasara Structure v. 18.4.24*¹¹² usando un campo de fuerza AMBER 14 de acuerdo con el protocolo previamente reportado por Vivar-Sierra et al, 2021¹¹³. Brevemente, cada uno de los cuatro complejos se incrustó dentro de una caja de agua TIP3 con 10 Å hasta el límite de la caja. Se consideraron condiciones de contorno periódicas. La temperatura se fijó en 298 K, el pH en 7,4, con la adición de iones de sodio y cloro para neutralizar la carga. Se aplicó un algoritmo de *Particle Mesh Ewald (PME)* con un radio de corte de 8 Å. Se realizó la minimización de la energía de descenso más pronunciada, y luego se llevó a cabo una simulación de interacción durante los primeros 100 ns de asociación con un intervalo de tiempo de 2,5 fs, registrando instantáneas a intervalos de 500 ps. El análisis de las trayectorias resultantes se realizó con un script incluido como parte del software Yasara e incluyó la desviación cuadrática media (RMSD) y la distancia del átomo de fósforo en el grupo γ -fosfato del ATP a los átomos de oxígeno del lado residuos de treonina de cadena (O (T) - γ P) identificados como los objetivos de fosforilación de PAK1.

5.5 SILENCIAMIENTO DE PAK1 CON SIRNAS

Para la transfección de siRNA, se sembraron células MDA-MB-231 a una densidad de 50,000 células por pozo en una placa de seis pozos durante 4 horas y posteriormente se transfectaron usando 10 nM de ON-TARGETplus Human PAK1 siRNA SMARTpool (Dharmacon UK #L-003521) / 9 μ L de Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, #13778100) posterior a 24h se realizó cambio de medio suplementado con SFB 10%, AA 1%.

5.6 SDS-PAGE

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 1X buffer de electroforesis (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%) a un voltaje constante de 120V. Una vez que se completó la electroforesis se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se realizó la transferencia a membranas de PVDF.

5.7 WESTERN BLOT

Las proteínas separadas electroforéticamente en el gel SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF. Para realizar el western blot, se preparó un bloque de transferencia de la siguiente manera: primero una esponja previamente humedecida en buffer de transferencia, dos papeles Whatman también humedecidos en el mismo buffer, luego el gel, la membrana de PVDF previamente activado con metanol absoluto seguido de dos papeles Whatman y una esponja. Al ensamblar este bloque 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). Este bloque se introdujo en la cámara de transferencia que se llenó con buffer de transferencia 1X hasta el límite indicado. Para evitar que el buffer se sobrecaliente e interfiera con el amperaje, la transferencia se realizó en un baño de hielo durante 60 minutos a 400 mA. Una vez completada la transferencia, 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 corroborada la transferencia de las proteínas, las membranas se bloquearon con leche baja en grasa 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 los anticuerpos correspondientes durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces durante 15 min con TBS-Tween al 0,1%. Después del último lavado, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa de rábano durante 2h 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 Clarity Western ECL Substrate (BIO-RAD). Después de este tiempo, las membranas se expusieron a una "Película de autorradiografía HyBlot ES® (Denville Scientific Inc.) y se escanearon para su evaluación

5.8 CO-INMUNOPRECIPITACION

Para la co-inmunoprecipitación, las células se lisaron durante 30 min en un buffer de baja astringencia PBSCM (tampón PBS (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) con CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM y ATP 5 μM) homogeneizado y centrifugado a 13,500 rpm durante 10 min a 4°C. Las muestras se recuperaron, preclarearon e incubaron con anticuerpos primarios durante 4 horas a 4°C seguido de incubación durante toda la noche con perlas de proteína G Sepharose (GE Healthcare, #GE17-0618-01). Los complejos inmunes se lavaron tres veces con buffer PBSCM 4°C, se resuspendieron en buffer de carga 4X y se resolvieron mediante SDS-PAGE y se inmunotransfirieron e incubaron con los anticuerpos deseados.

5.9 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se sembró la línea celular HEK293T en cubreobjetos y se cotransfectaron transitoriamente con los vectores de expresión pCMV6M-Pak1 y pEGFP-C1-CaMKII, 48 horas después de la transfección se fijaron con paraformoldehído (PFA) al 4% durante 30 min, se lavaron tres veces con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 durante 10 min y se bloqueó con albúmina al 1% en 1X PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron durante la noche con anticuerpos anti-myc y se lavaron con 1X PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 594 (Invitrogen). De igual forma las células SK-BR-3 y MDA-MB-231 se transfectaron transitoriamente con el vector de expresión pEGFP-C1-CaMKII y siguiendo el mismo procedimiento. Se obtuvieron imágenes de las células teñidas usando un microscopio Confocal Leica TCS SP8x. La co-localización de Pak1 y CaMKII y se cuantificó utilizando el software de complemento *Coloc2* de *ImageJ* (NIH).

5.10 MICROARREGLO DE TEJIDOS DE CÁNCER DE MAMA

Se obtuvieron muestras de cáncer de mama de al menos 100 mg del núcleo tumoral del Fox Chase Cáncer Center, en el momento de la cirugía de cada paciente según un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional. Las muestras fueron verificadas como carcinomas mamarios invasores por un patólogo e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C para posteriores preparaciones de ensayo. El patólogo del equipo revisó los portaobjetos de hematoxilina y eosina archivados que se utilizaron para el diagnóstico para confirmar el diagnóstico y seleccionar los bloques de tejido incluidos en parafina adecuados para la construcción del microarreglo. Se seleccionaron y mapearon portaobjetos con el tejido de interés apropiado para definir áreas representativas para la construcción de los bloques de TMA utilizando un tamaño de punzón de 1,5 mm.

5.11 INMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOPSIAS CONTENIDAS EN MICROARREGLOS DE TEJIDOS DE CÁNCER DE MAMA.

Secciones de 4µm del microarreglo de tejidos, fueron desparafinadas en xilol y rehidratados a través de series de alcohol y teñidos mediante inmunohistoquímica sencilla. Brevemente, se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio a 0.01M, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se incubó por 30 minutos en 1% de solución de peróxido de hidrógeno. Posteriormente, se bloqueó durante 1 hora en 8% de BSA. Las laminillas fueron incubadas con el anticuerpo primario toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda, anti-CamKII (dilución 1:1000), anti Pak1 (dilución 1:250). Después, las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP usando el kit Immpress HRP Reagent (Vector Laboratories). La señal se amplificó utilizando el Kit ImmPACT DAB peroxidase substrate (Vector Laboratories). Posteriormente el tejido fue deshidratado bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones fueron cubiertas con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

5.12 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CAMKII Y PAK1 EN LOS MICROARREGLO DE TEJIDOS

El análisis de expresión de las proteínas CaMKII y Pak1 en los microarreglos de tejidos se evaluó mediante patología digital con el digitalizador de imágenes *Scanscope CS* (Aperio, San Diego, CA. USA). La cuantificación se realizó utilizando el algoritmo recomendado por el fabricante. Brevemente, el equipo cuantifica la intensidad de expresión total por célula y le asigna un valor numérico de acuerdo con el grado de intensidad, intensidad alta, intensidad moderada, intensidad baja o intensidad nula. Se promediarán las intensidades descartando el valor de la intensidad nula. Las escalas cuantitativas de intensidad y porcentaje se clasificaron en 4 y 5 clases o niveles, respectivamente, después de que fueron determinados los valores de corte en los tres spots para cada paciente incluido en el MAT.

5.13 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR MTT

La viabilidad de las células después de diferentes concentraciones de FRAX-1036 y KN-93 fue determinada usando el reactivo MTT (CellTiter Blue, Promega, # G808A). Todos los tratamientos se realizaron utilizando 5,000 células en placas de 96 pozos y posterior a 48 horas de tratamiento, los cristales de formazan fueron disueltos en DMSO, y la absorbancia fue medida usando un lector de microplaca (*TECAN Fluoremwter Infinite F500*) a una longitud de onda de 570nm.

5.14 ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE SINERGISMO

El índice de combinación (IC) entre inhibidores farmacológicos se estableció mediante el método de Chou-Talalay¹¹⁴. Usamos el paquete de software CalcuSyn (BioSoft, UK) para automatizar los cálculos. Brevemente, para cada fármaco probado, se estableció una curva de IC₅₀ en cada línea celular y se usó para seleccionar dosis de combinación de fármacos para pruebas de sinergia posteriores. Se sembraron 5,000 células por pozo en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas, las células se trataron con diluciones en serie de inhibidores individuales o combinaciones de dos inhibidores mantenidos en una proporción molar constante. Después de 72 horas de incubación, se midió la viabilidad celular usando CellTiter Blue (Promega, # G808A). Los valores de CI para cada dosis y la

citotoxicidad correspondiente se expresaron como la fracción afectada (Fa) y se calcularon usando el software informático *CalcuSyn* y se presentaron como gráficos Fa-CI.

5.15 ENSAYO DE ACTIVIDAD RELATIVA DE CASPASA 3 Y 7

La apoptosis se midió utilizando el ensayo Glo Caspase 3/7 (Promega) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se sembraron 5,000 células de la línea celular MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231 y MBCDF-B4 en placas de cultivo celular de pared blanca de 96 pozos y se trataron con vehículo, el inhibidor de Pak FRAX1036 (Afraxis, Inc. La Jolla, CA), el inhibidor de CaMKII KN93 (Cat. # 422712) o la combinación de ambos inhibidores. Se colocaron 100 µL del reactivo Caspase 3/7 Glo en cada pozo de la placa de cultivo celular, y la mezcla se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente en la oscuridad, y la placa se leyó en un luminómetro de lectura de placas (*TECAN Fluoremwter Infinite F500*).

5.16 ENSAYO DE MIGRACIÓN TIPO TRANSWELL

Para los ensayos de migración, se agregaron 50,000 células de la línea celular MDA-MB-231 y cultivo primario MBCDF-B4 en la cámara superior en medio sin suero con los inhibidores de Pak1 y CaMKII mientras que la cámara inferior contenía medio de cultivo celular suplementado con SFB al 10%, AA 1%. Después de 24h de incubación, las células se fijaron con metanol al 70% durante 15 min y se tiñeron con cristal violeta (0,2%) durante 15 min. Las células que migraron a través de la cámara se contaron eligiendo 3 campos aleatorios para cada condición, posteriormente se disolvió el cristal violeta con 100µL de DMSO se colocaron en una placa de 96 pozos y la absorbancia fue medida usando un lector de microplaca (*TECAN Fluoremwter Infinite F500* a una longitud de onda de 570nm posteriormente y los datos se analizaron con el software *ImageJ* y *GraphPad Prism 8.0*.

5.17 ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA

La línea celular MDA-MB-231 y el cultivo primario MBCDF-B4 se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos hasta una alta confluencia (90%), las monocapas se rasparon con una punta de pipeta de 200 μ L después de que las células hubieran alcanzado una confluencia del 90-95% y se trataron con vehículo, el inhibidor de Pak FRAX1036, el inhibidor de CaMKII KN93 o la combinación de ambos inhibidores. Se observó el cierre de la herida en diferentes puntos de tiempo dentro de la línea de raspado (0 horas, 24 horas) y se fotografiaron líneas de raspado representativas. 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*.

5.18 ENSAYO DE MIGRACIÓN ALEATORIA TIEMPO REAL

Se cultivaron 5,000 células MDA-MB-231 y el cultivo primario MBCDF-B4 en DMEM o RPMI-1640 respectivamente suplementado con SFB al 10%, penicilina 50U/ml y estreptomycin 50 mg/mL, se trataron con HEPES 20 mM y se colocaron en una platina calentada (37°C) de una Olympus. Microscopio IX71. Las imágenes se recolectaron usando una cámara Retiga SRV CCD, cada 5 minutos durante 16 horas usando el software *Image-Pro-Plus*. Todas las secuencias de lapso adquiridas se mostraron como una película y las células se rastrearon usando *ImageJ*. El análisis matemático se llevó a cabo utilizando *Chemotaxis and Migration Tool 2.0* donde se calcula la velocidad de migración celular media y la distancia acumulada para cada célula y estos datos se utilizan para calcular una velocidad de migración celular media para cada población.

5.19 ENSAYO DE DEGRADACIÓN DE GELATINA FLUOROSCENTE

Para los ensayos de invadopodia, se utilizó el ensayo de invadopodia de gelatina QCM™ (Sigma-Aldrich # ECM670) ¹¹⁵. Brevemente, se preparó gelatina conjugada con FITC como se describió previamente. Los cubreobjetos lavados con etanol se recubrieron con gelatina conjugada con FITC y se fijaron con glutaraldehído. Las

células se sembraron en los cubreobjetos recubiertos de gelatina y se incubaron durante 3 horas a 37°C antes de teñirse con inmunofluorescencia. La degradación de la gelatina de cada célula productora de invadopodia se midió utilizando el plugin de degradación de gelatina con el software ImageJ.

5.20 ENSAYOS DE ACTIVACIÓN DE RHOA TIPO G-LISA

Para la evaluación del efecto de los inhibidores de Pak1 y CaMKII sobre la actividad de RhoA se utilizó un ensayo basado en ELISA en el cual permite medir la actividad de RhoA (Cytoskeleton #KB124). Brevemente, se sembraron 5,000 células de la línea celular MDA-MB-231 en placas de 96 pozos, y se depleto de suero fetal bovino por 24 horas, 4 horas antes de cumplir el ayuno se colocaron los inhibidores farmacológicos de Pak1 y CaMKII y posteriormente se estimuló la actividad de RhoA con LPA (1 µg/mL) por 15 min. Las células se lavaron con PBS 1X 4°C y se colocó 100µL de buffer de lisis suplementado con inhibidores de fosfatasas y proteasas, Para posteriormente colocarse el reactivo de detección A y tras 1 hora de incubación se colocó el reactivo de detección B y se mantuvo en incubación a 37°C durante 60 min. Las placas se lavaron 3 veces con PBS 1X 4°C, se añadió 100 µL de peroxidasa de rábano (HRP) incubándose por 20 min. Se utilizó un lector de placas (TECAN Fluoremwter Infinite F500) y la absorbancia a una longitud de onda de 490nm.

5.21 XENOINJERTOS DE TUMORES

Se obtuvieron ratones hembras endogámicas Nu/J *nu/nu* de 4 a 6 semanas de edad del bioterio de animales CINVESTAV (número de protocolo aprobado: 0307-2). Se inyectaron células MDA-MB-231 (500,000 células en 0,3 ml de RPMI-1640 con 5% de Matrigel) en la almohadilla de grasa mamaria de cada ratón. Los ratones se trataron con vehículo o inhibidor de Pak FRAX1036 a una dosis de 20 mg/kg/día vía oral o el inhibidor de CaMKII KN-93 por vía intraperitoneal a una dosis de 1 mg/kg/día, en los grupos de combinación, los compuestos se administraron con un intervalo de 4-6 h. Al finalizar todos los estudios de xenoinjerto, se llevó a cabo la eutanasia de los ratones, se extirparon los tumores y se estimaron los volúmenes

de los tumores con la siguiente fórmula: $\text{volumen} = (a^2 \times b)/2$, donde a= longitudes tumorales cortas y b= largas, respectivamente, en milímetros.

5. 22 ANALISIS ESTADISTICOS

El análisis estadístico se realizó utilizando la t de Student no pareada. Las relaciones entre los niveles de expresión de diferentes marcadores evaluados en el TMA se examinaron usando correlación de rango de Spearman. Para los estudios de xenoinjerto, las cohortes de tratamiento se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional utilizando el paquete de software *GraphPad 8.0*. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

6. RESULTADOS

6.1 PAK1 INTERACCIONA CON CAMKII *IN SILICO*

Pak1 participa en la regulación de diferentes vías de señalización que controlan procesos oncogénicos en el cáncer de mama, como la vía de las MAPK, y la vía de Akt/mTOR ¹¹⁶. Recientemente se han identificados nuevos sustratos que afectan positivamente la proliferación celular como la fosforilación de β -Catenina. Con el objetivo de descubrir nuevas vías de señalización controladas por Pak1 en 2013 Chernoff y colaboradores ¹¹⁷ emplearon un microarreglo de fosforilación que contenía varias docenas de anticuerpos específicos contra proteínas fosforiladas relevantes en cáncer de mama, estas laminillas fueron incubadas con lisados de células de cáncer de mama deficientes de Pak1 o con lisados de células silvestres, este experimento sugirió que probablemente existían nuevos sustratos de Pak1 que no habían sido reportados anteriormente y que por separado son relevantes en la biología del cáncer de mama. Uno de los potenciales nuevos sustratos fue CaMKII, la cual presentó una disminución de aproximadamente el 50% de la fosforilación en la T287. Con el objetivo de comprobar que Pak1 podría fosforilar a CaMKII en la T287, durante mi trabajo de maestría realizamos un ensayo de cinasa *in vitro* en el que se observó que Pak1 fosforila *in vitro* dos sitios localizados en el dominio de regulación de CaMKII, los residuos T277 y T287. Sin embargo, para expandir el conocimiento sobre las potenciales interacciones entre ligandos y cofactores con cinasas como Pak1 y comprender si estos dos aminoácidos son cruciales para la interacción de éstos se llevaron a cabo experimentos de “*docking* molecular” *in silico*. Con este propósito, se generaron mediante modelado por homología *in silico* las probables estructuras de dos fosfopéptidos correspondientes a los aminoácidos LKHPWVCQRSTVASMMHRQET y STVASMMHRQETVSLRKFNAR de CaMKII, en donde los residuos de T subrayados y en negritas corresponden a las posiciones 277 en el péptido I y 287 en el péptido II respectivamente. La estructura cristalográfica del dominio catalítico de Pak1 activo y unido a ATP se obtuvo del sitio *Protein Data Bank*. Posteriormente, las estructuras de ambos fosfopéptidos fueron acopladas mediante *docking* al

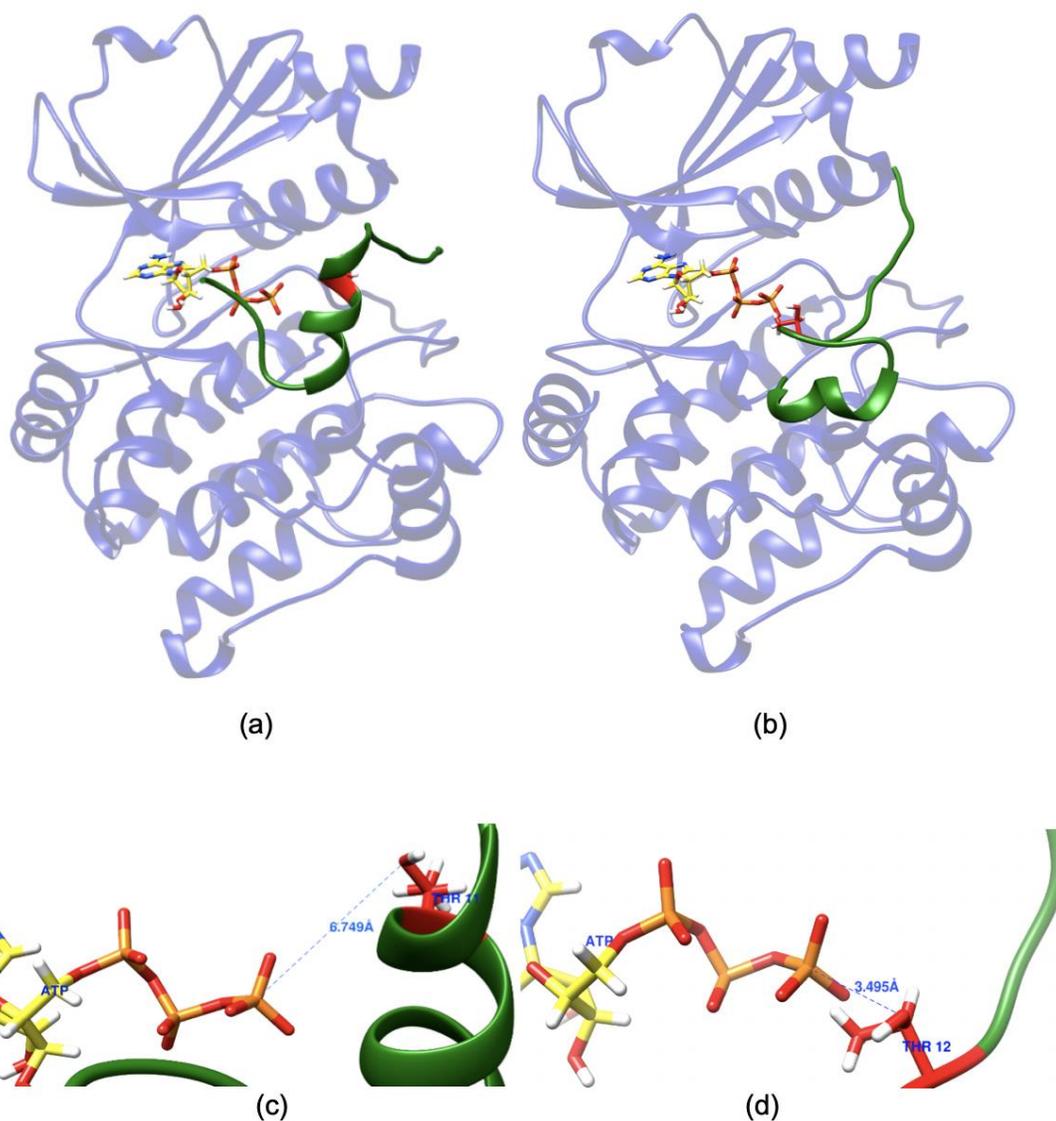


Figura 17. Visualización del complejo del péptido I y péptido II con Pak1 unido a ATP. Las figuras (c) y (d) muestran una vista más cercana de la interacción O-(T)- γ P para los péptidos I y II, respectivamente.

dominio catalítico de Pak1. En la figura 17 se muestra la distancia de los átomos de oxígeno de los residuos T11 y T12 al átomo de fósforo de ATP es de 6.75 Å y 3.5 Å respectivamente, donde este último presenta una mejor reacción de fosforilación por un mecanismo disociativo. Posteriormente se llevo a cabo un ensayo de dinámica molecular para analizar la estabilidad de los complejos predicha por el “*docking* molecular” y averiguar si los cambios conformacionales modifican la

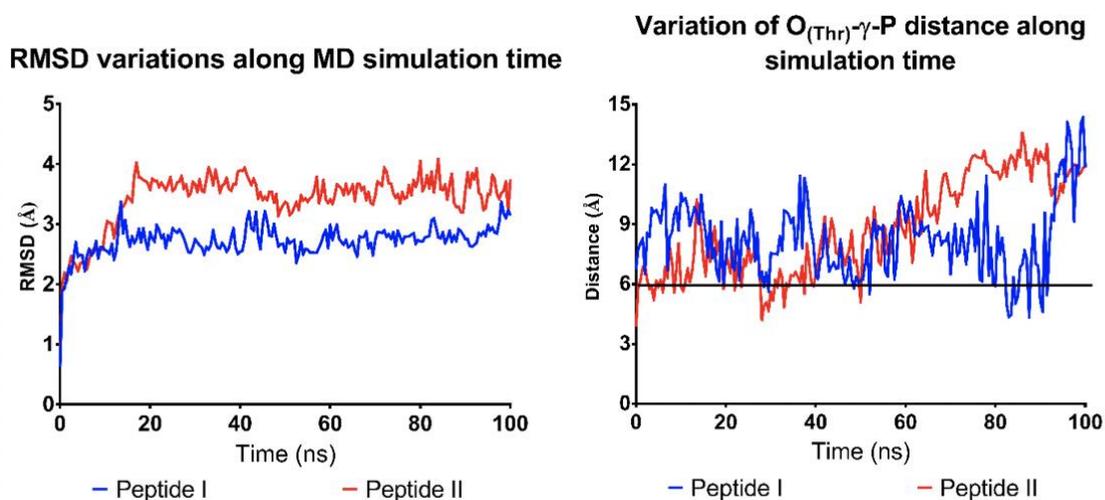


Figura 18. Variaciones de la distancia RMSD y O-(T)-γP en las simulaciones de MD con péptidos I y II.

distancia del grupo fosfato y del ATP. La figura 18 ilustra los gráficos de la desviación media de la raíz cuadrática (RMSD) y las variaciones en la distancia de los átomos de oxígeno de los residuos de treonina hacia el grupo fosfato y del ATP. El gráfico de las variaciones de RMSD muestra que el complejo predicho por acoplamiento molecular sufre importantes cambios conformacionales dentro de los primeros 20 ns de la simulación hasta que alcanza variaciones por debajo de 2 Å, lo que sugiere que se alcanzó la convergencia. El análisis de las variaciones en la distancia O-(T)-γP para ambos complejos mostró que la distancia podría ser inferior a 6 Å después de las primeras 20 ns, particularmente para el péptido II con valores alrededor de 4,25 Å. Estas variaciones parecen estar impulsadas por los residuos Arg9 en la vecindad de los residuos Ts, que es un rasgo característico del reconocimiento del sustrato CaMKII γ . Motivados por estos resultados, decidimos realizar estudios de acoplamiento molecular proteína-proteína con CaMKII γ . Inicialmente, hicimos los cálculos con la forma autoinhibida, que es la que está disponible en el PDB. En la Figura 19 se muestran las imágenes de los complejos

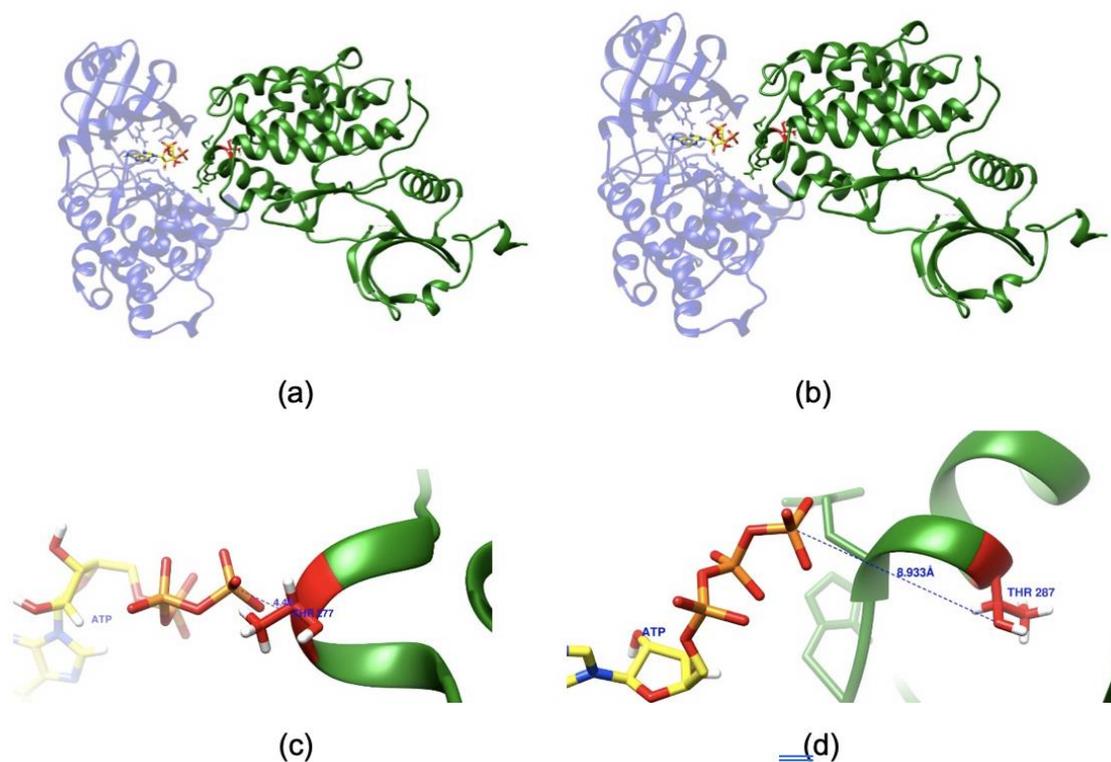


Figura 19. Visualización del complejo de CaMKII γ con PAK1 unido a ATP cuando los residuos de (a) T277 y (b) T287 están más cerca del grupo γ -fosfato. Las figuras (c) y (d) muestran una vista más cercana de la interacción O (Thr) - γ P para cada pose (a) y (b), respectivamente.

predichos cuando T277 y T287 están más cerca de ATP. En el caso de la T277, probablemente este residuo esté suficientemente expuesto para ser fosforilado por Pak1 ya que la distancia O (T277) - γ P es de 5,21 Å, estando dentro del rango de distancias para el estado de transición de la reacción de fosforilación. Sin embargo, para la fosforilación de T287, este aminoácido está "oculto" dentro de una hélice α que dificulta el acceso al sitio activo de Pak1, como se ve en la Figura 19b, con una distancia de 8,93 Å. A pesar de este resultado, decidimos continuar las simulaciones de modelado molecular de estos complejos para observar si un posible cambio conformacional podría conducir a una aproximación de T287 al grupo γ -fosfato en ATP. El gráfico de la variación RMSD (Figura 20a) de los complejos proteína-proteína indica que ambos complejos presentan alta flexibilidad, llegando a converger hasta los últimos 20 ns de la simulación. El análisis de la variación de la distancia O-(T)- γ P, que se muestra en la Figura 20b, confirma que es poco probable

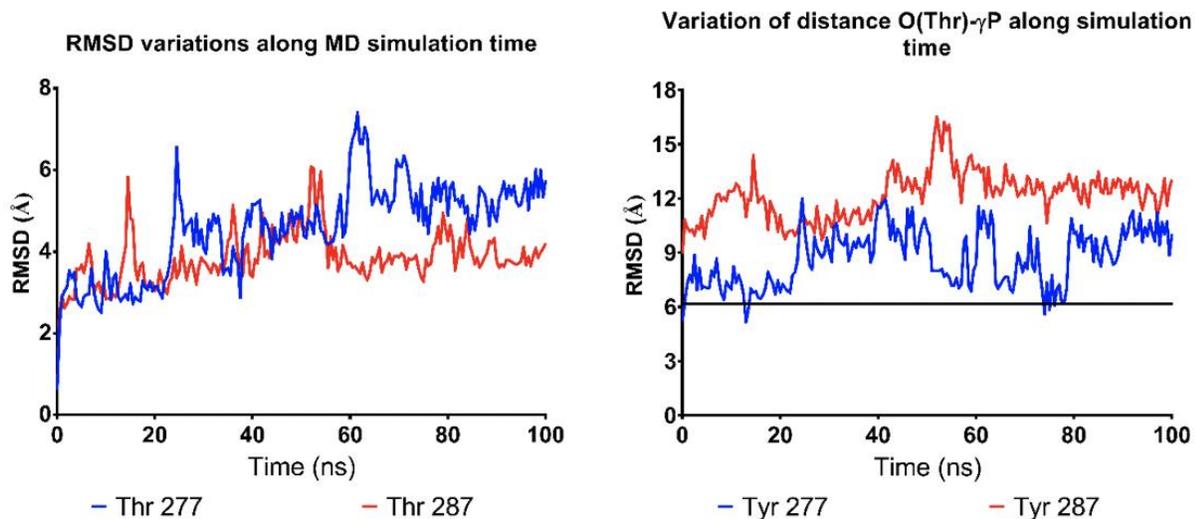


Figura 20. Variaciones de (a) RMSD y (b) distancia O (T)- γ P en las simulaciones MD para los complejos predichos de CaMKII-PAK1 donde los residuos T277 y T287 se acercan al ATP. La línea horizontal en (b) indica la distancia máxima propuesta para el estado de transición para una reacción de fosforilación.

que Pak1 fosforila los residuos de T277 y T287 en su estado autoinhibido desde la distancia O-(T)- γ P aumenta notablemente. Aún así, los datos generados durante las simulaciones con los péptidos I y II indican que es pausable que la transferencia de grupos fosfato se produzca una vez que la calmodulina haya activado CaMKII. Estos resultados indican fuertemente que CaMKII es un sustrato directo de Pak1.

6.2 EL SILENCIAMIENTO DE PAK1 CON SIRNA REDUCE SIGNIFICATIVAMENTE LA FOSFORILACIÓN DE CAMKII (PT287)

Aunque los estudios *in silico* e *in vitro* sugieren que CaMKII es un sustrato de Pak1, decidimos comprobarlo en un contexto celular, para esto utilizamos la línea celular de cáncer de mama subtipo triple negativo MDA-MB-231 que ha sido reportado que expresa altos niveles de Pak1¹¹⁸, en la cual llevamos a cabo un silenciamiento utilizando siRNAs específicos contra el mensajero de Pak1, y como control una secuencia "scramble" los cuales fueron lipo-transfectados y tras 24h se llevaron a cabo lisados proteicos que fueron utilizados para semi-cuantificar los niveles de

Pak1, CaMKII y CaMKII pT287. Como esperábamos el silenciamiento redujo 60% los niveles de proteína de Pak1 y al igual que los resultados del microarreglo de fosfoanticuerpo se redujo un 50% la fosforilación activadora (pT287) en la cinasa CaMKII (Figura 21).

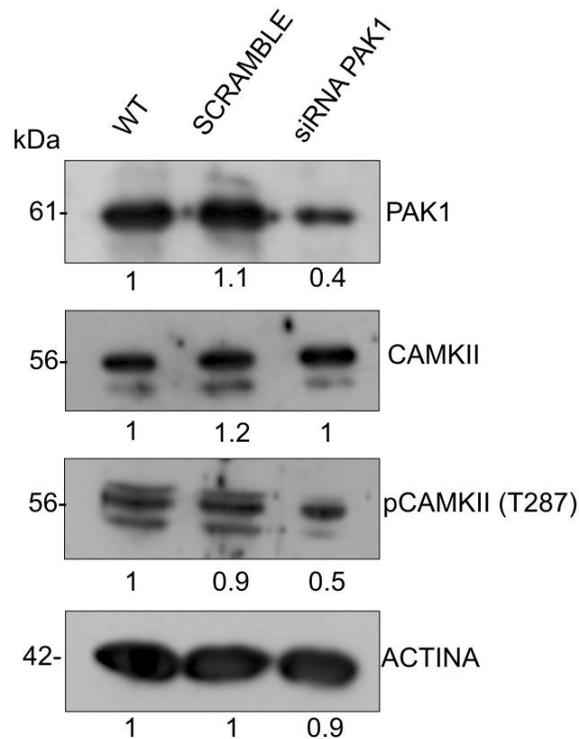


Figura 21. El silenciamiento de Pak1 reduce la fosforilación de CaMKII (pT287).

6.3 LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PAK1 REDUCE SIGNIFICATIVAMENTE LA FOSFORILACIÓN DE CAMKII (PT287)

Aunque la actividad enzimática de Pak1 es la más importante en la regulación de vías de señalización también se ha reportado que puede funcionar como una proteína de andamiaje y a la vez regular diversas vías de señalización tal es el ejemplo de PDK1/Akt ¹¹⁹, en la cual el dominio de cinasa de Pak1 funciona como andamio para PDK1 y a su vez estimular a Akt facilitando su translocación a la

membrana plasmática. Debido a este antecedente los resultados del silenciamiento previamente mostrados, abrían la posibilidad de que la disminución de los niveles de fosforilación de CaMKII en sus sitios de activación se debía a la pérdida de su función de andamiaje y no de su actividad catalítica, para contestar esta pregunta, nosotros llevamos a cabo un ensayo de inhibición farmacológica con el inhibidor FRAX-1036 (Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one, 6-[2-chloro-4-(6-methyl-2-pyrazinyl)phenyl]-8-ethyl-2-[[2-(1-methyl-4-piperidiny)ethyl]amino]) el cual es un inhibidor específico y competitivo por el “pocket” de ATP del dominio catalítico de Pak1, inhibiendo su función enzimática y conservando su función de andamiaje, permitiéndonos contestar si la disminución de la fosforilación activadora de CaMKII se debe a la pérdida de la actividad de cinasa de Pak1 o la pérdida de su actividad como proteína de andamiaje. Tras 4 horas de inhibición farmacológica y posterior estimulación con EGF, observamos que la línea celular MDA-MB-231 mostró una disminución del 50% de la fosforilación en la T287 (Figura 22A), y para comprobar esto repetimos el experimento utilizando un cultivo primario de cáncer de mama

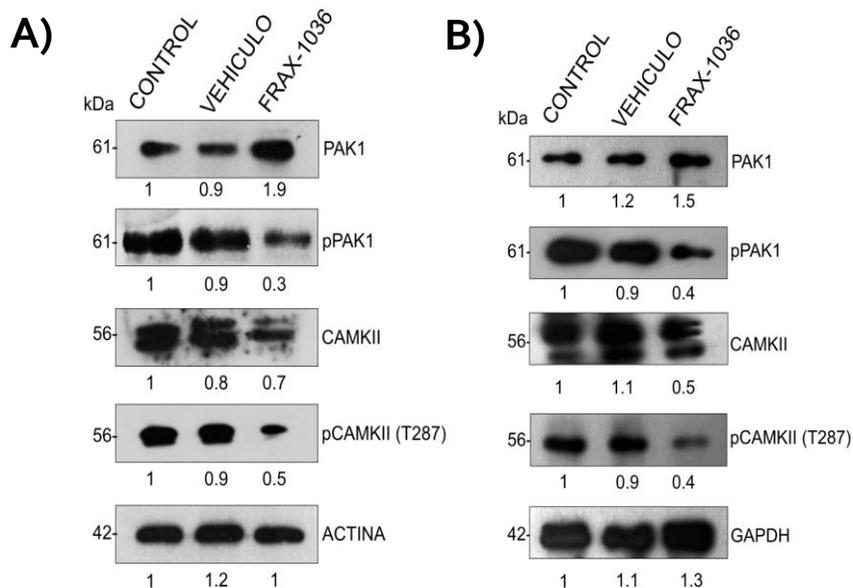


Figura 22. Efecto de la inhibición farmacológica de Pak1 sobre la fosforilación activadora de CaMKII (pT287). A) MDA-MB-231, B) MBCDF-B4

subtipo triple negativo (MBCDF-B4), mostrando un resultado similar (-60%) (Figura 22B). Por lo que todos estos resultados sugieren que la fosforilación activadora de CaMKII esta dada por la actividad de cinasa de Pak1 y no por funcionar como una proteína de andamiaje.

6.4 LA ACTIVACIÓN INDUCIBLE DE PAK1 AUMENTA SIGNICATIVAMENTE LA FOSFORILACIÓN DE CAMKII (pT287).

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que Pak1 fosforila directamente a CaMKII en la T287, ya que su depleción proteica o inhibición farmacológica disminuyen los niveles de fosforilación de esta proteína, por lo que hipotetizamos que la inducción de la actividad enzimática de Pak1 provocaría un estado de hiperfosforilación como el que se habitualmente se observa al sobreexpresar una oncocinasa. Para este abordaje experimental transfectamos a la línea celular HEK293T (que presenta bajos niveles de Pak1 en comparación con una línea de cáncer de mama) con un vector de expresión eucarionte que contiene el cDNA de Pak1 fusionado al de la proteína fluorescente Venus en su extremo 5'. Este vector, también tiene clonada la secuencia que codifica al dominio uniRapR dentro del dominio catalítico de Pak1, lo que permite que se exprese una versión de la proteína Pak1 cuya actividad es inducida con Ramapicina. (pVENUS-uniRapR-PAK1) ¹²⁰. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de VENUS-uniRapR-Pak1 cuya expresión fue estimulada con Rapamicina provocó una hiperfosforilación de CaMKII en T287 (Figura 23). En conjunto estos 3 resultados demuestran que Pak1 fosforila directamente a CaMKII en la T287.

6.5 PAK1 Y CAMKII ESTAN ALTAMENTE EXPRESADOS EN LINEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HUMANO Y EN UN CULTIVO PRIMARIO TRIPLE NEGATIVO DERIVADO DE PACIENTE.

Se ha reportado que cerca del 55% de los tumores mamarios malignos presentan una sobreexpresión y/o hiperactividad de Pak1, independientemente del subtipo molecular al que pertenezcan ¹²¹. Sin embargo, en el caso de CaMKII no existe evidencia contundente que apoye el mismo fenómeno. Para averiguar si CaMKII al igual que Pak1 se encuentra sobreexpresada en los diferentes subtipos moleculares

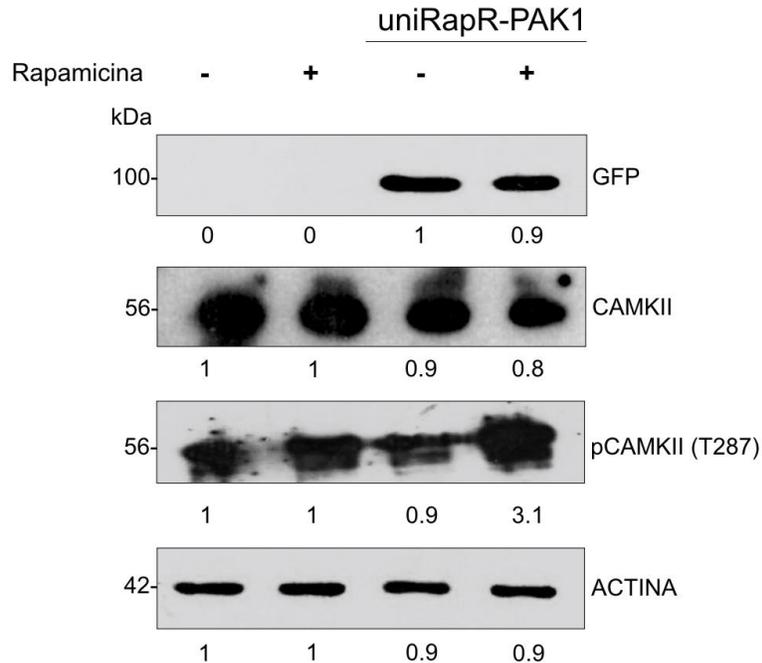


Figura 23. Efectos de la activación de Venus-uniRapR-PAK1 sobre la fosforilación de CaMKII (pT287).

de cáncer de mama realizamos un análisis de expresión a nivel de proteína por medio de Western blot utilizando anticuerpos contra CaMKII y Pak1 en lisados celulares provenientes de 3 líneas celulares de cáncer de mama cada una representativa de un subtipo molecular: MCF-7 (Subtipo luminal), SK-BR-3 (HER2+), MDA-MB-231 (triple negativo) y como control no transformado una línea celular de epitelio mamario (MCF-10A) (Figura 24). Para el caso de Pak1 observamos una sobreexpresión en todas las líneas celulares tumorogénicas siendo la línea MDA-MB-231 la que presento mayores niveles de Pak1 (1:3.7), lo cual correlaciona con la agresividad de este subtipo molecular. En el caso de CaMKII al igual que Pak1 mostró una sobreexpresión en las líneas celulares tumorales, sin embargo, la línea celular representativa del subtipo HER2+ (SK-BR-3) mostró los mayores niveles de expresión (1:3.6) seguido de la línea celular MDA-

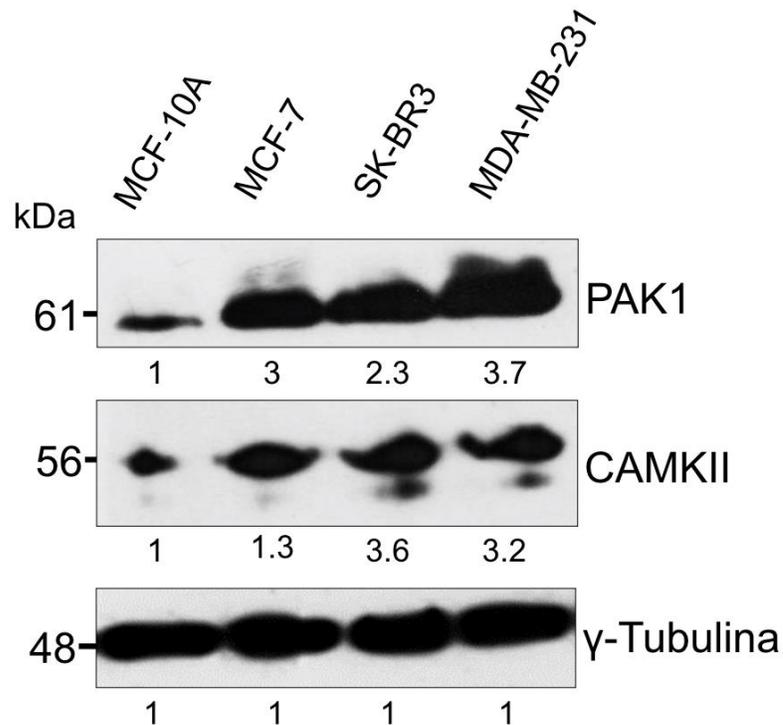


Figura 24. Expresión a nivel de proteína de las cinasas Pak1 y CaMKII en líneas celulares de cáncer de mama.

MB-231 (1:3.2). Debido a que la línea celular MDA-MB-231, en comparación con la línea celular representativa del subtipo luminal o HER2 presentaba los mayores

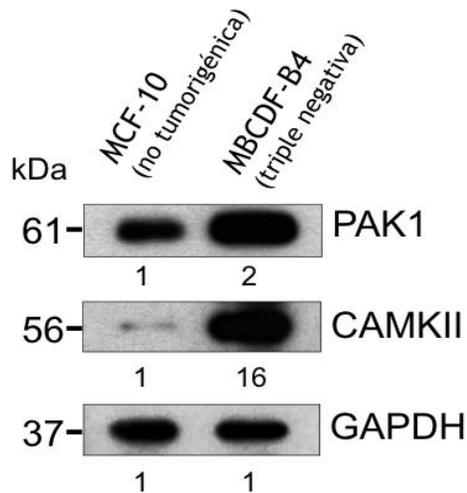


Figura 25. Expresión a nivel de proteína de las cinasas Pak1 y CaMKII en un cultivo de cáncer de mama.

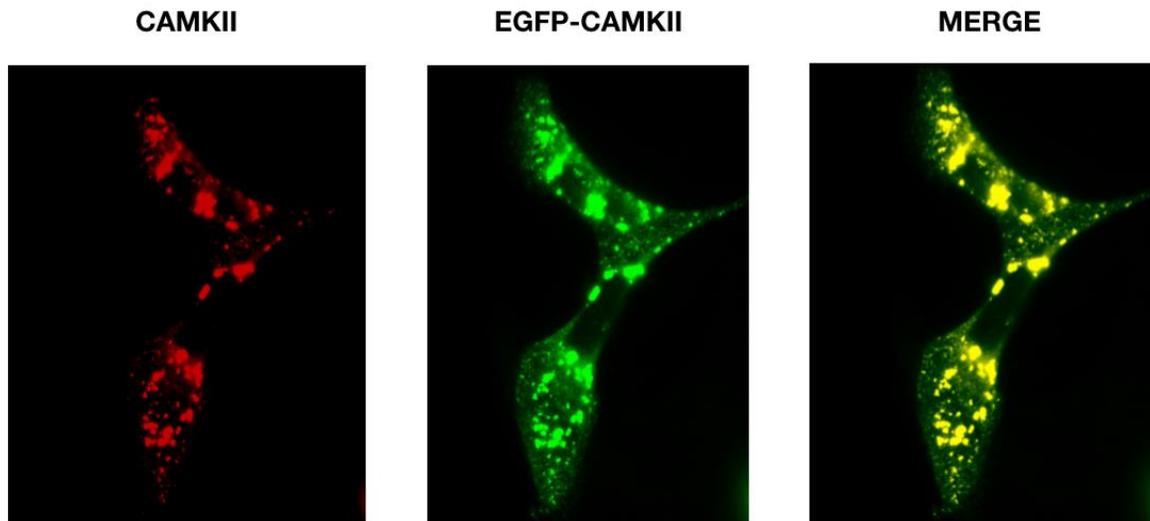


Figura 26. Patrón de expresión de EGFP-CaMKII y CaMKII endógena en la línea celular HEK-293T mediante inmunofluorescencia.

niveles de expresión de Pak1 y CaMKII, corroboramos este resultado en un cultivo primario de cáncer de mama triple negativo (MBCDF-B4) encontrando nuevamente una sobreexpresión de ambas cinasas (Figura 25)

6.6 PAK1 Y CAMKII INTERACTÚAN FÍSICAMENTE Y COLOCALIZAN EN UN CONTEXTO CELULAR EN LINEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HUMANO, EN UN CULTIVO PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA Y EN UNA LINEA CELULAR NO RELACIONADA.

Nuestros experimentos *in silico* e *in vitro* indican que posiblemente existe una interacción física entre Pak1 y CaMKII. Por lo que, para comprobar que Pak1 y CaMKII interactúan en un contexto celular, utilizamos la línea celular HEK-293T derivada de riñón de embrión humano, con el fin de utilizar un contexto celular fuera de la transformación maligna del epitelio mamario. Esta línea celular fue co-transfectada con los vectores de expresión eucarionte pCMV6M-Pak1 L107F que contiene el cDNA de una forma constitutivamente activa de Pak1 fusionada a una bandera de myc, y el vector pEGFP.CaMKII, el cual fue construido en nuestro laboratorio. Este plásmido contiene a el gen que codifica a la proteína verde

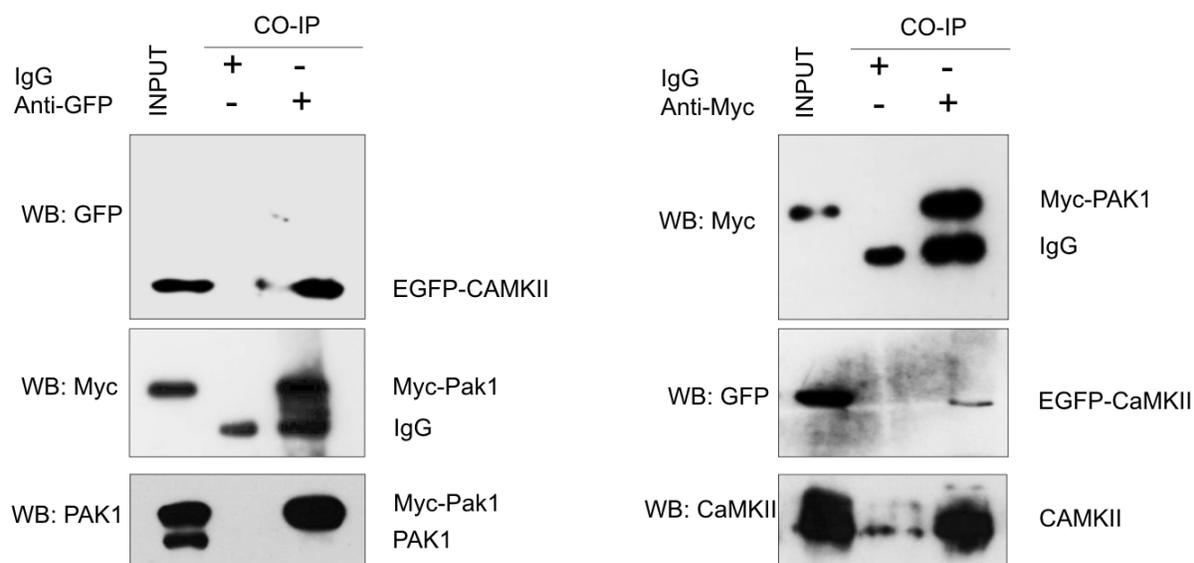


Figura 27. Co-inmunoprecipitación de Myc-Pak1 con EGFP-CaMKII en la línea celular HEK-293T.

fluorescente seguido de la secuencia codificante de CaMKII γ . Debido a que la bandera de la proteína verde fluorescencia es grande y tiene un peso de 27 kDa esta pudiera modificar el patrón de expresión fisiológico de esta cinasa, realizamos una inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos anti GFP y anti-CaMKII con el fin de determinar que la proteína exógena presentara la misma localización

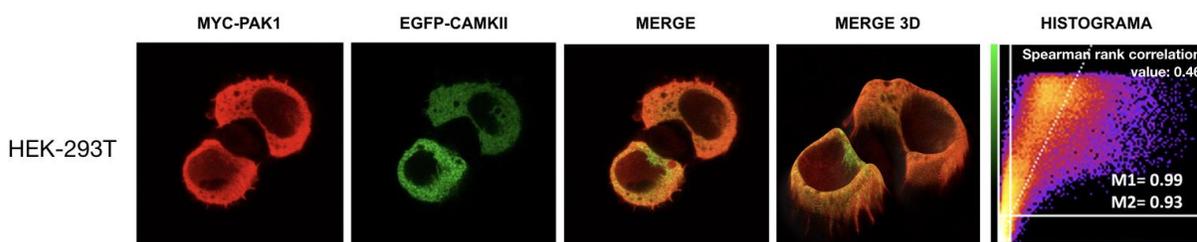


Figura 28. Co-localización de Myc-Pak1 con EGFP-CaMKII en la línea celular HEK-293T.

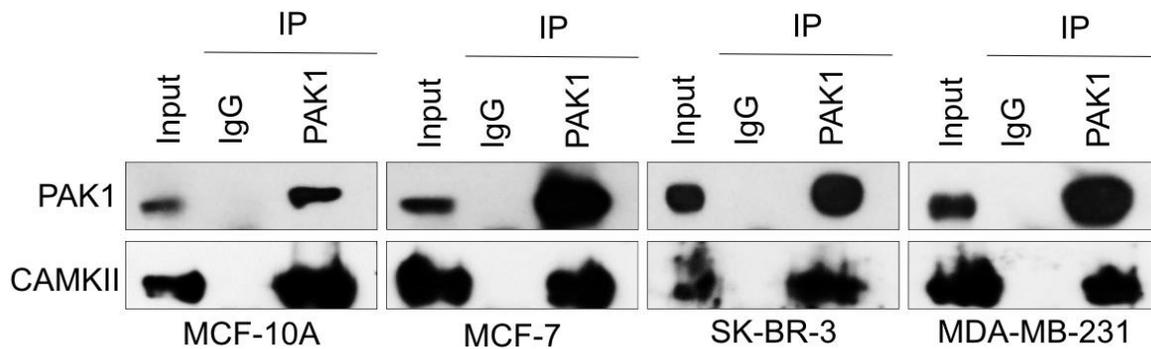


Figura 29. Co-inmunoprecipitación de Pak1 con EGFP-CaMKII en líneas celulares de cáncer de mama.

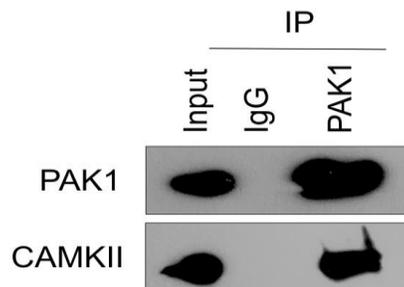


Figura 30. Co-inmunoprecipitación de Pak1 con CaMKII en un cultivo de cáncer de mama subtipo triple negativo

que la proteína endógena (Figura 26). Tras 48h de transfección realizamos una inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos anti-GFP y CaMKII, observando que EGF-CaMKII muestra los mismos sitios de expresión que CaMKII endógena, confirmando que la bandera de GFP no interfiere en la localización fisiológica de CaMKII. Posteriormente para confirmar la interacción de ambas proteínas realizamos una co-inmunoprecipitación utilizando lisados celulares de la línea HEK293-T co-transfectada con pCMV-6M-PAK1 L107F y pEGFP-CaMKII utilizando anticuerpos anti-Myc y anti-GFP (Figura 27). En concordancia con el resto de los experimentos, se observó que Pak1 interactúa físicamente con CaMKII. Empero una

de las desventajas de los experimentos de co-inmunoprecipitación es que utilizamos lisados celulares donde los compartimentos subcelulares fueron destruidos, y posiblemente al desaparecer esta compartimentalización obligamos a que Pak1 y CaMKII interactúen artificialmente, por lo cual llevamos a cabo experimentos de colocalización por inmunofluorescencia (Figura 28) observando que efectivamente Pak1 interactúa físicamente con CaMKII.

Los experimentos anteriores en la línea celular HEK-293T nos permitió observar que sobreexpresando Myc-Pak1 y EGFP-CaMKII estas proteínas co-inmunoprecipitan e interactúan en un contexto celular. Por lo que entonces procedimos a confirmar estas observaciones en líneas celulares de cáncer de mama en las cuales se sobre-expresan ambas proteínas. Para lo cual inicialmente se realizaron co-inmunoprecipitaciones con lisados provenientes de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB-231 y como control la línea no transformada de epitelio mamario MCF-10A lo cual nos permitiría saber si la interacción de ambas proteínas se daba únicamente en cáncer de mama o también ocurre en situaciones fisiológicas (Figura 29). Encontrándose que Pak1 y CaMKII forman un complejo proteico en todas las líneas celulares de cáncer de mama e interesantemente también forman un complejo en la línea no transformada MCF-10A sugiriendo que está asociación también sucede de forma fisiológica en los epitelios mamarios y posiblemente su desregulación este relacionada con la oncogénesis mamaria. Estos hallazgos también fueron observados en lisados de un cultivo primario de cáncer de mama triple negativo (Figura 30). Posteriormente utilizamos las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR3 (HER2+) y MDA-MB-231 (Triple negativo) ya que presentaban altos niveles de PAK1 y fueron transfectadas con el plásmido pEGFP-CaMKII para realizar experimentos de colocalización por inmunofluorescencia indirecta, esto debido a que no contábamos con un anticuerpo anti-CaMKII elaborado en diferente especie que el anticuerpo anti-Pak1. Tras 48h de lipotransfección y estimulación con EGF, observamos una colocalización positiva en la línea SK-BR3 y MDA-MB-231 (Figura 31). En conjunto estos experimentos muestran que las cinasas Pak1 y CaMKII se encuentran

sobreexpresadas a nivel de proteína en líneas celulares de cáncer de mama humano con predominio en SKBR-3 (HER2+) y MDA-MB-231 (triple negativo) además la cinasa PAK1 interactúa con la proteína CaMKII en líneas celulares de cáncer de mama, en un cultivo primario del subtipo triple negativo y en una línea celular no relacionada (HEK-293T), lo que corrobora que es un sustrato de PAK1.

6.7 PAK1 Y CAMKII SE ENCUENTRAN CO-EXPRESADOS EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES EN BIOPSIAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO

En los experimentos de western blot pudimos observar que en líneas celulares de cáncer de mama representativas de cada subtipo molecular existe una sobreexpresión de Pak1 y CaMKII (Figura 24). Sin embargo, se ha demostrado que en el proceso de generación de las líneas celulares, se modifican y se pierden características propias del tumor original, generando controversia en la extrapolación de resultados provenientes de líneas celulares, por cual validamos los

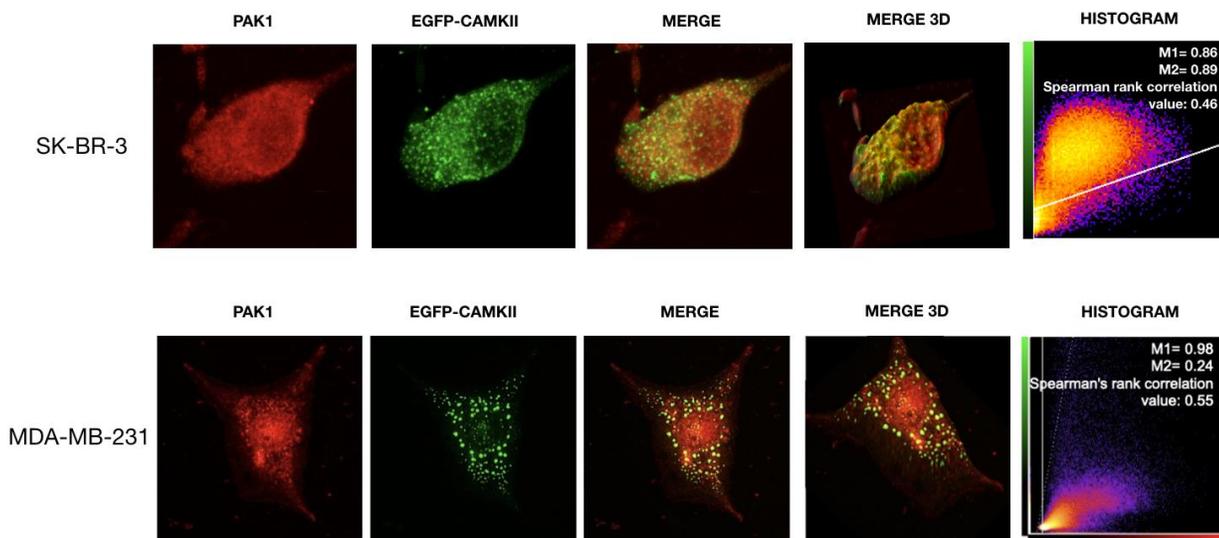


Figura 31. Co-localización de Pak1 con EGFP-CaMKII en líneas celulares de cáncer de mama. Imágenes de microscopia confocal, en el panel superior la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 (HER2+) y en el panel inferior la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (Triple negativo)

resultados observados anteriormente utilizando un microarreglo de tejidos (TMA) con 187 biopsias de cáncer de mama humano obtenidas del “Fox Chase Cáncer Center” y donados por el Dr. Jonathan Chernoff. Este microarreglo fue construido a

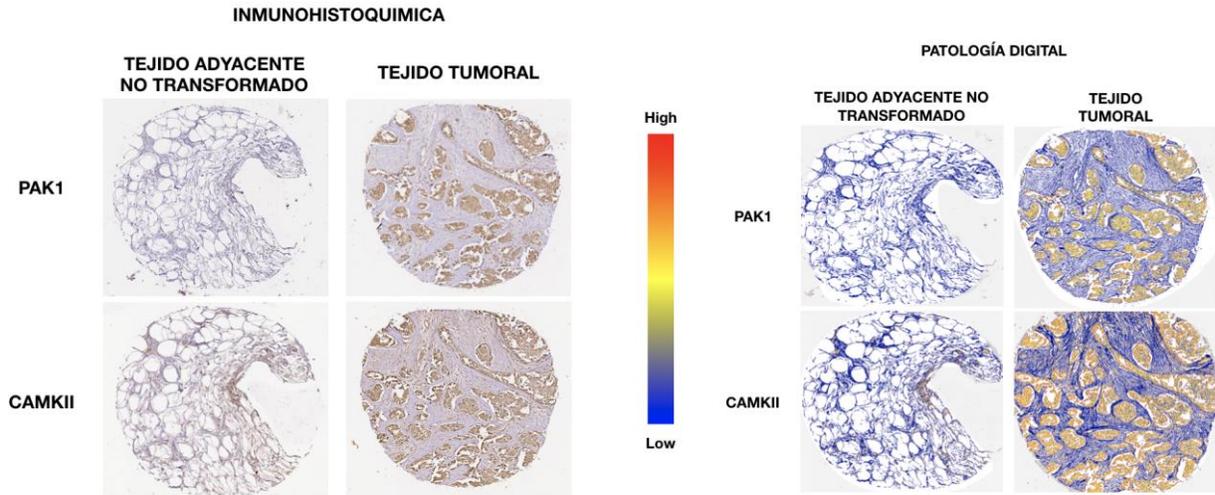


Figura 32. Estudio de inmunohistoquímica para Pak1 y CaMKII en biopsias de cáncer de mama humano.

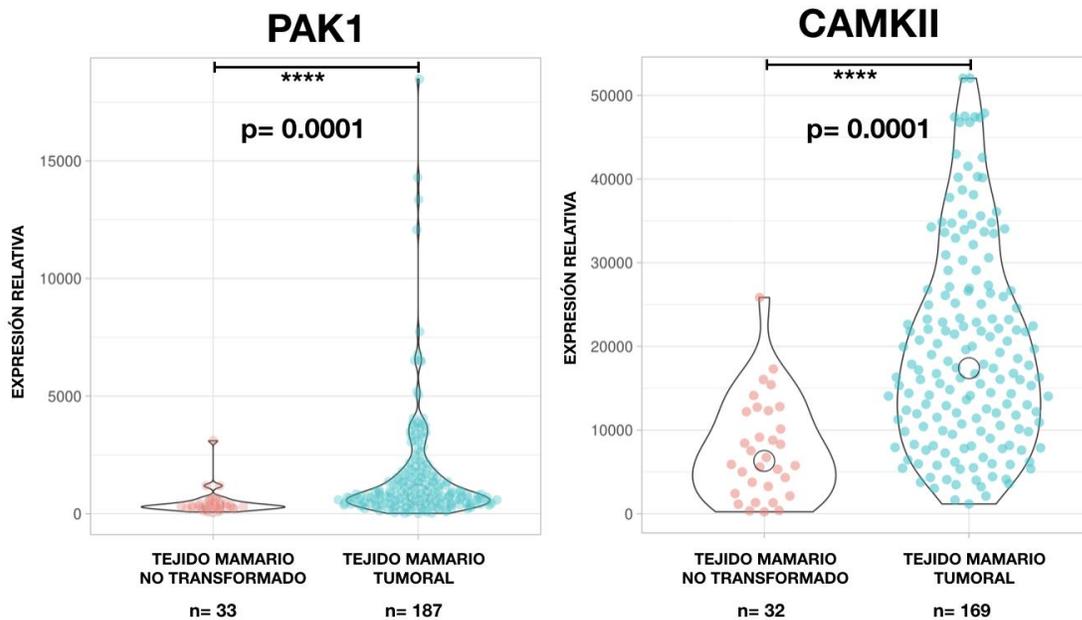


Figura 33. Las cinasas Pak1 y CaMKII se sobreexpresan en tejido mamario tumoral.

través de tejido de cáncer de mama y tejido no tumoral adyacente en bloques de parafina previamente caracterizados por HE e IHC analizando las siguientes características: histología, grado histológico, expresión del RE, progesterona, HER2 y subtipo molecular. Todas las biopsias contenían un historial clínico completo con los siguientes datos reportados: genero, etnia, edad al diagnóstico, lateralidad tumoral, procedimiento quirúrgico realizado, tamaño tumoral, nódulos linfáticos involucrados, historia de tabaquismo, historia de alcoholismo, historia familiar de cáncer de mama, lugar del tumor, tratamiento administrado posterior a la biopsia. Las 187 muestras fueron distribuidas en 4 TMAs y se utilizaron 2 cortes de cada TMA para llevar a cabo inmunohistoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra Pak1 y contra CaMKII. Los resultados de expresión de Pak1 y CaMKII en tejido transformado y no transformado adyacente se muestran en la figura 32 (Panel izquierdo), donde podemos observar una sobreexpresión de ambas cinasas en tejido tumoral en comparación con el tejido no transformado adyacente. En donde podemos ver que la tinción se centra en las células tumorales presentando baja expresión en la matriz extracelular lo que es un indicativo de la alta especificidad

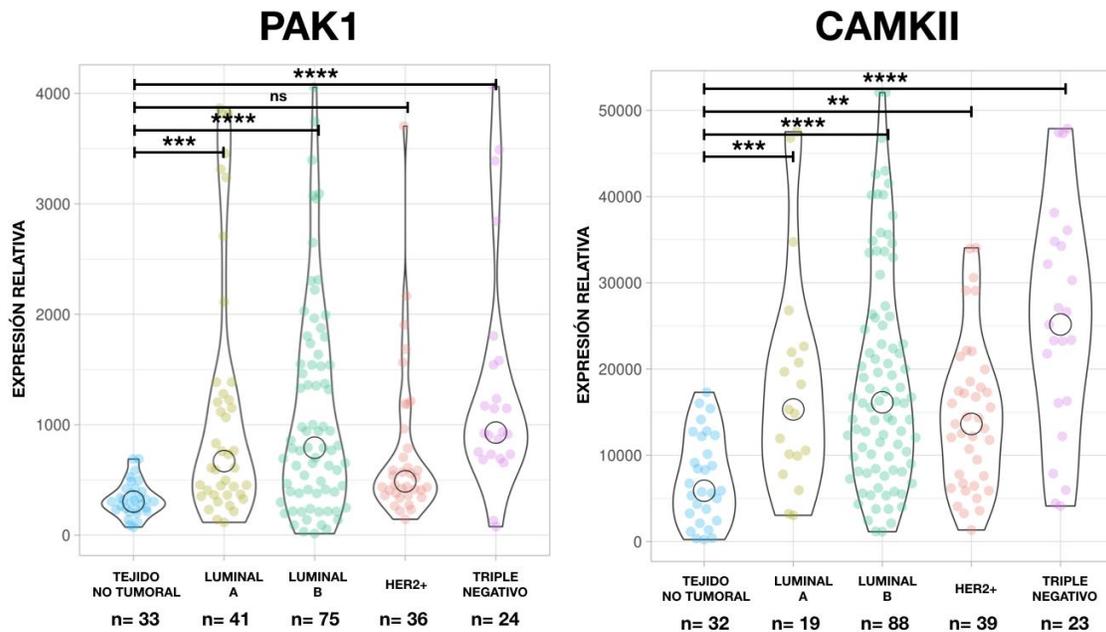


Figura 34. La expresión de Pak1 y CaMKII en los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama humano.

del anticuerpo, posterior a la inmunohistoquímica, los TMA se digitalizaron a un objetivo de 20x y se analizaron por medio del software *Aperio ImageScope*. En el panel derecho de la figura 32 observamos la digitalización de 4 “spots” donde el color rojo representa una alta intensidad de tinción y en azul una baja intensidad de tinción, bajo este histograma de colores se pueden cuantificar la expresión relativa de Pak1 y CaMKII para conocer si estas dos proteínas se encuentran sobreexpresadas en cáncer de mama y cual es el subtipo molecular que presenta mayor expresión. Una vez cuantificada la expresión relativa de Pak1 y CaMKII se compararon los niveles del tejido transformado versus el tejido mamario no transformado, observando que efectivamente el tejido tumoral presenta una sobreexpresión significativa ($p=0.0001$) tanto para Pak1 como para CaMKII, validando los resultados que observábamos en las líneas celulares (Figura 33). Posteriormente analizamos si esta sobreexpresión era exclusiva de algún subtipo molecular o al igual que en las líneas celulares entre mayor agresividad mayor

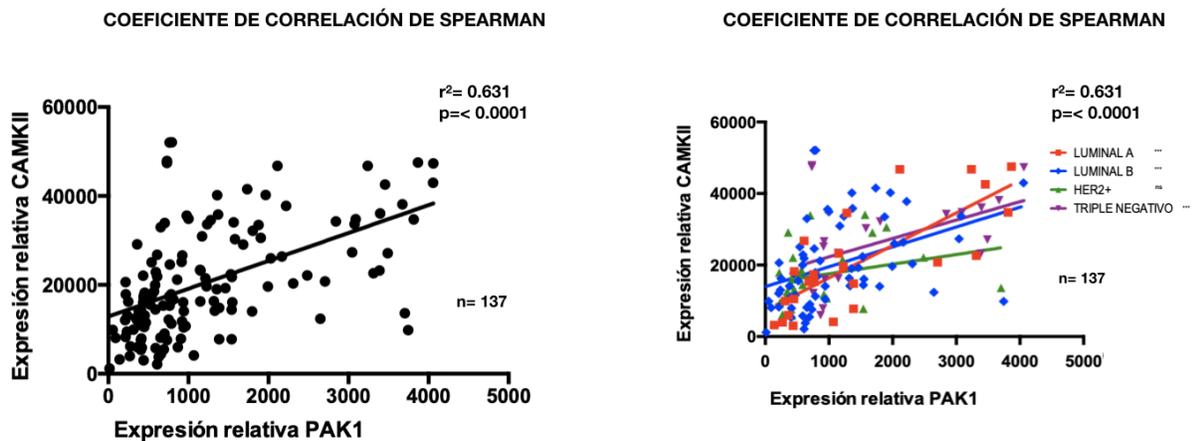


Figura 35. Correlación de la expresión de Pak1 y CaMKII en cáncer de mama humano.

expresión de ambas cinasas. Las biopsias fueron clasificadas en subtipo Luminal A (RE+, RP+, HER2-, Grado histológico 1-2), Luminal B (RE+, RP+/-, HER2+/-, Grado histológico 3), HER2+ (RE-, RP-, HER2+), Triple negativo (RE-, RP-, HER2-) y posteriormente se analizó la expresión relativa de Pak1 y CaMKII. En el caso del

microarreglo teñido con el anticuerpo anti-Pak1 se observó una sobreexpresión significativa en los subtipos luminal A, luminal B, y Triple negativo, siendo este último quien presento una mediana mayor que el resto de los otros subtipos. Sin embargo, en el caso del subtipo HER2+ no se observó una sobreexpresión al compararlo con el tejido no tumoral. En contraparte el microarreglo teñido con el anticuerpo contra CaMKII mostró una sobreexpresión significativa en todos los subtipos moleculares con una predominancia en el subtipo triple negativo (Figura 31). Estos resultados son acorde a los observados en líneas celulares exceptuando la expresión de Pak1 en el subtipo HER2+, sin embargo es de llamar la atención que estas dos proteínas se sobreexpresan en el subtipo triple negativo el cual es altamente agresivo y no se cuenta con un tratamiento dirigido, tomando relevancia el eje de señalización Pak1/CaMKII en estos pacientes. Uno de los hallazgos observados en líneas celulares de cáncer de mama es que los subtipos más agresivos presentaban mayores niveles de ambas proteínas. Tomando en cuenta

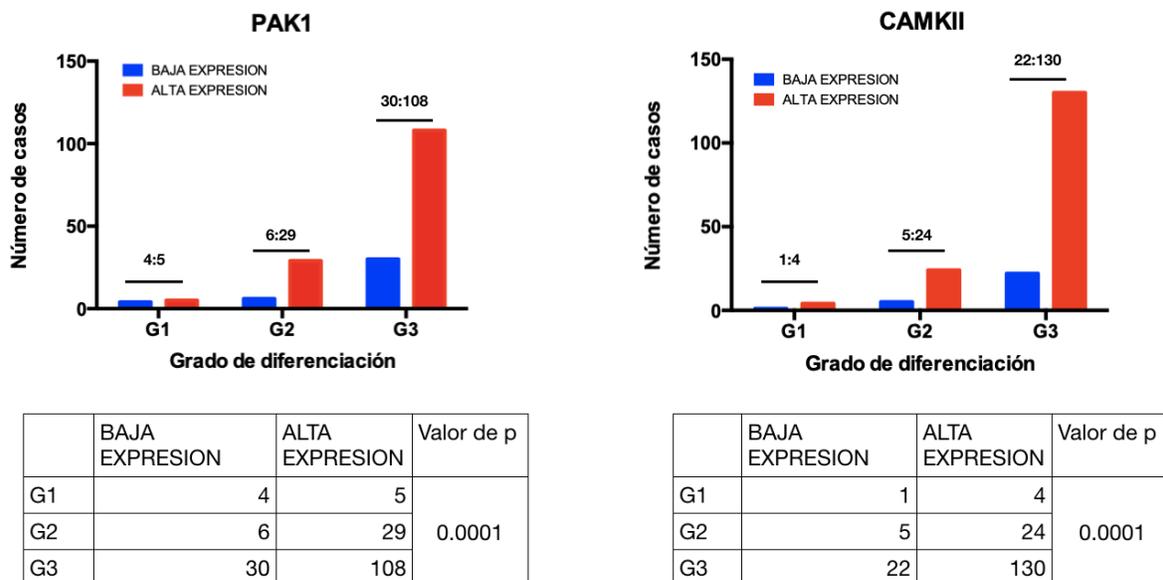


Figura 36. Asociación de la expresión de Pak1 y CaMKII y el grado de diferenciación en cáncer de mama humano.

esto, analizamos el coeficiente de correlación de Spearman para muestras no paramétricas, con el objetivo de medir la fuerza y dirección de la asociación entre la

expresión de Pak1 y CaMKII en todas las biopsias del TMA (Figura 35 panel izquierdo), los resultados de este análisis mostraron una correlación positiva ($r^2=0.631$, $p<0.0001$) entre mayor expresión de Pak1 mayor expresión de CamKII, sin embargo cuando analizamos esta correlación por subtipo molecular, solo los subtipos moleculares luminal A, luminal B, triple Negativo presentaron una correlación positiva y significativa (Figura 35, panel derecho) y como esperábamos el subtipo HER2+ no mostró una correlación positiva aunque se observó cierta tendencia positiva. Finalmente agrupamos los tumores de acuerdo a su grado de diferenciación (G1-3) y los dividimos en baja expresión y alta expresión de Pak1 y CaMKII tomando como punto de corte el máximo de expresión del tejido no transformado, interesantemente los tumores con grado de diferenciación G3 fueron los que presentaron una mayor expresión de Pak1 (30:108) y de CaMKII (22:130) (Figura 36) En conjunto estos resultados muestran que las cinasas Pak1 y CaMKII no solamente se encuentran sobreexpresadas en líneas celulares si no de manera importante en biopsias de cáncer de mama humano, en el caso de Pak1 se encuentra sobreexpresada en biopsias del subtipo molecular luminal A, luminal B y triple negativo y en el caso de CaMKII se encuentra sobreexpresada en todos los subtipos moleculares. Esta sobreexpresión correlaciona positivamente entre la expresión de Pak1 y CaMKII en biopsias de cáncer de mama del subtipo molecular luminal A, luminal B y triple negativo, exceptuando al subtipo HER2+ asimismo existe una asociación positiva entre el grado histológico del tumor y la sobreexpresión de Pak1 y CaMKII.

6.8 SUSCEPTIBILIDAD DE DISTINTAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA A LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE PAK1 Y CAMKII.

Como Pak1 y CaMKII parecen actuar en una vía de señalización activada por RTKs y este eje posiblemente esté involucrado en el desarrollo de cáncer de mama humano, proseguimos con probar el efecto del bloqueo farmacológico individual y combinado, en la sobrevivencia de las líneas celulares de cáncer de mama. Para la inhibición farmacológica de Pak1 utilizamos nuevamente la molécula FRAX-1036, y para la inhibición de CaMKII a KN93, cuyo mecanismo de acción es impedir la unión

del complejo calcio/calmodulina al dominio regulatorio de CaMKII evitando así su activación ¹²². Nuevamente utilizamos las 3 líneas celulares de cáncer de mama representativas de cada subtipo molecular MCF-7, SK-BR-3 Y MDA-MB-231 y como control de epitelio mamario no transformado MCF-10A, estas fueron tratadas con concentraciones variables de estos inhibidores por 48 horas y los efectos en la sobrevivencia fueron analizados indirectamente por la reacción mitocondrial de MTT (Figura 37). Tanto FRAX-1036 como KN93 presentaron mayores efectos sobre la sobrevivencia de las líneas celulares cancerígenas en comparación de la línea no transformada y por lo tanto IC₅₀ menores, en el caso de la línea MCF10A la IC₅₀ de FRAX-1036 fue de 10 µM y de KN93 de 32µM. Los valores de IC₅₀ para FRAX-1036 en MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB-231 fueron de 9, 3 y 5 µM respectivamente y para KN93 en MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB-231 fueron de 20, 17 y 20 µM. Posteriormente utilizamos la línea celular MDA-MB-231 representativa del subtipo triple negativo para la administración de los inhibidores en combinación. La razón de seleccionar esta línea celular sobre la línea SK-BR-3 es que aunque esta presento mejores resultados en las dosis de IC₅₀ los resultados en biopsias de cáncer de mama humano de este subtipo (HER2+) mostró que no había una sobreexpresión ni correlación de Pak1 y CaMKII significativa (Figura 34 y 35) además para el subtipo triple negativo no existe un tratamiento dirigido a diferencia del subtipo HER2+ en el cual clínicamente se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor HER2. Nuestros resultados mostraron que la administración combinada de FRAX-

1036 y KN93 presento una IC₅₀ menor que la monoterapia (FRAX-1036 2µM y KN93 8µM) (Figura 38).

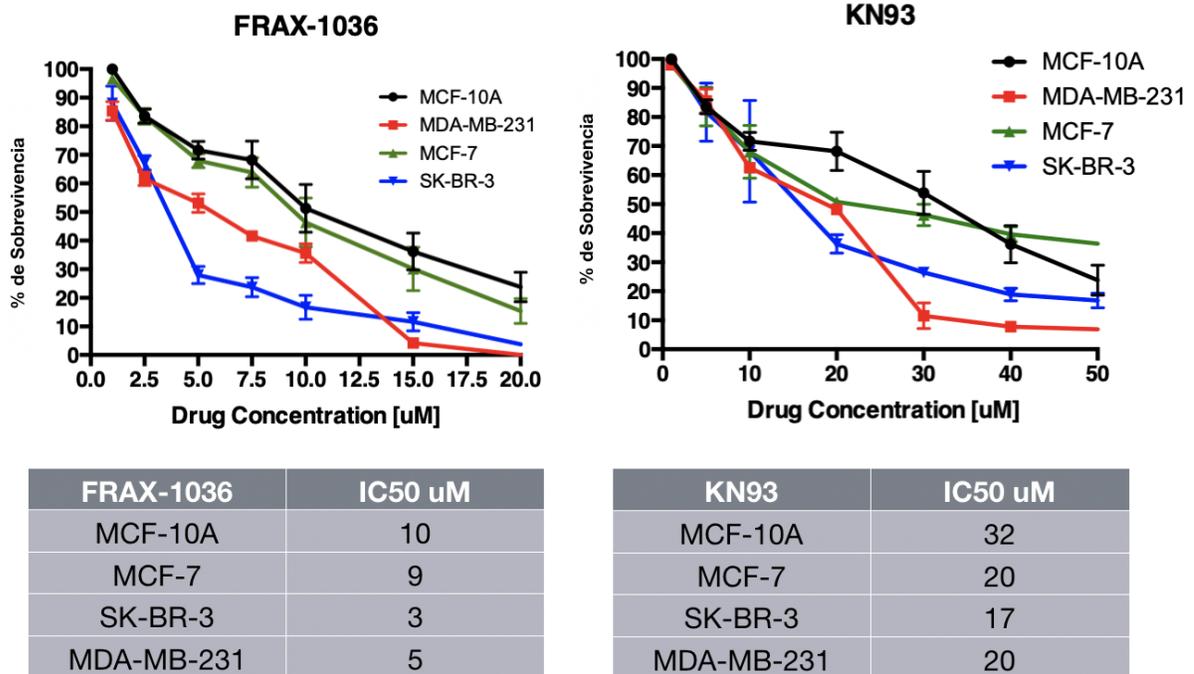


Figura 37. Ensayo de MTT para determinar el valor de IC₅₀ de FRAX-1036 y KN-93 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.

6.9 EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS EFECTOS COMBINADOS DE FRAX-1036 MÁS KN-93 MUESTRA UN EFECTO SINERGICO EN LA LINEA CELULAR MDA-MB-231 (TRIPLE NEGATIVO) ASÍ COMO EL CULTIVO PRIMARIO TRIPLE NEGATIVO DERIVADO DE PACIENTE

La reducción de la IC₅₀ cuando se usan los inhibidores en combinación sugería un posible efecto sinérgico, para comprobar esta hipótesis utilizamos el método de

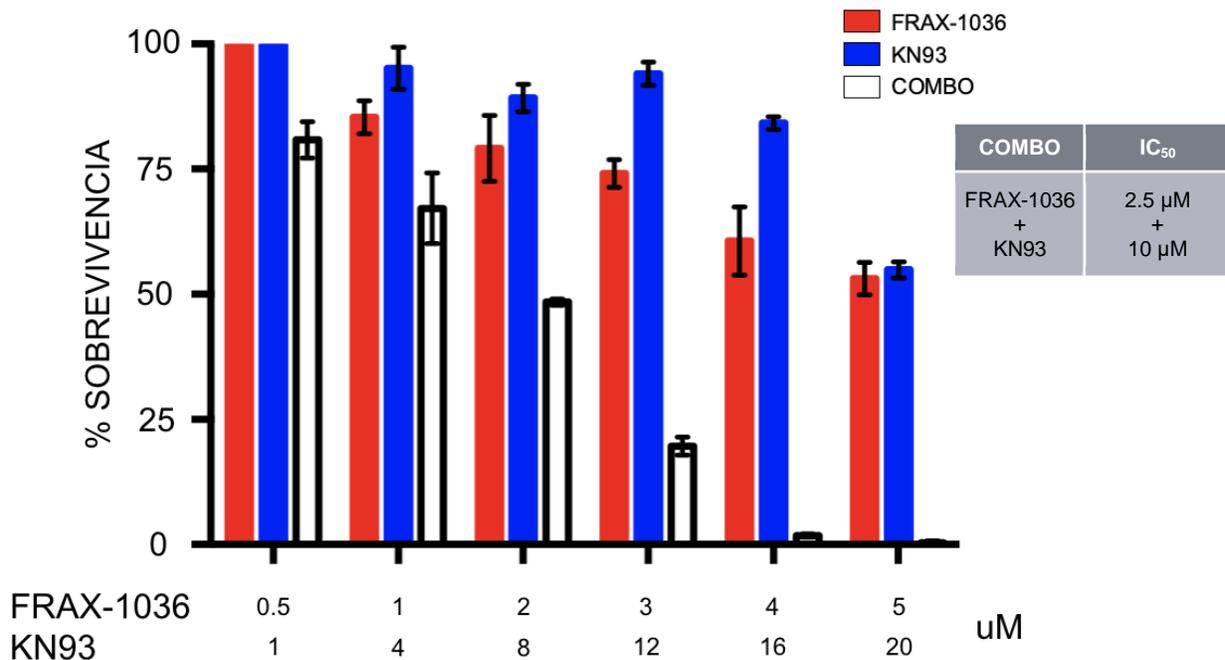


Figura 38. Ensayo de MTT para determinar el efecto sinérgico de la combinación de FRAX-1036 y KN93 en la línea celular MDA-MB-231.

Chou-Talalay ¹²³ este método está basado en la ley de acción de masas, el cual proporciona la relación entre una entidad única y múltiples y las dinámicas de primer y segundo orden. El resultado fue que existe un fuerte efecto sinérgico con una favorable reducción de dosis (Figura 39). Estos resultados fueron comprobados en un cultivo de cáncer de mama triple negativo, presentado valores de IC₅₀ para FRAX-1036 de 2.5μM y de KN93 de 8.3 μM de igual forma un fuerte efecto sinérgico con una favorable reducción de dosis (Figura 40).

6.10 LA COMBINACIÓN DE FRAX-1036 Y KN-93 TIENEN UN EFECTO TÓXICO EN LINEAS CELULARES DE CANCER DE MAMA Y EN UN CULTIVO PRIMARIO TRIPLE NEGATIVO DERIVADO DE PACIENTE.

Una droga citotóxica es aquella que destruya células cancerosas en contra parte con una droga citostática que causan daño celular no selectivo ¹²⁴. El observar que

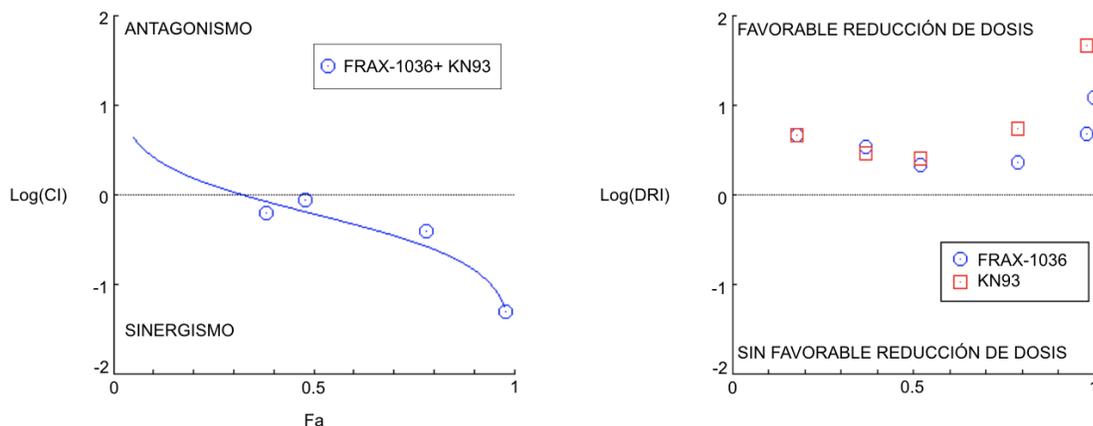


Figura 39. Curva de IC (Índice de combinación) e IRD (Índice de reducción de dosis) por ecuación de Chou Talalay para la combinación de FRAX-1036/KN93 en la línea celular MDA-MB-231.

tanto FRAX-1036 como KN93 disminuye la tasa de reducción mitocondrial de MTT sugería que las células podrían entrar en apoptosis (efecto citotóxico celular) o un cambio de proliferación a quiescencia (actividad citostático celular). El efecto citotóxico es producido por la inducción de la apoptosis intrínseca a través de la activación de las caspasas efectoras 3 y en algunos casos 7. Para comprobar si el efecto observado en los ensayos de reducción de MTT era debido a un efecto citotóxico o citostático medimos la actividad de la caspasa 3/7 mediante en ensayo de Caspasa-GLO 3/7, el cual es un ensayo luminiscente que mide la actividad de estas caspasas en células en proceso de apoptosis a través de añadir un substrato luminógeno con la secuencia consenso de procesamiento de las caspasas 3/7, este corte provoca la generación de una señal luminiscente la cual es directamente proporcional a la actividad de la caspasa presente. Para este objetivo se utilizaron nuevamente las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (luminal), SK-BR-3 (HER2+), MDA-MB-231 (Triple negativo) y como control no transformado MCF-10A,

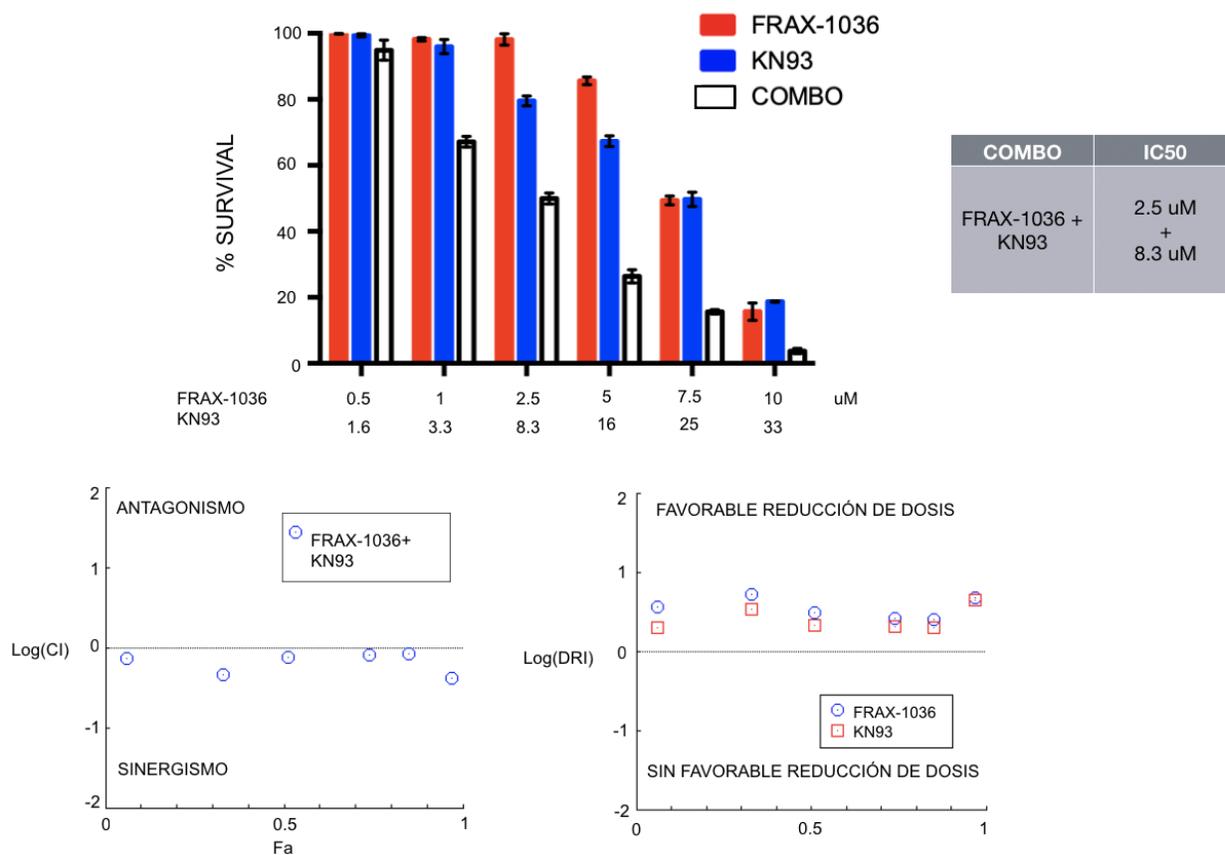


Figura 40. Ensayo de determinación de sinergia por MTT y curva de IC (Índice de combinación) e IRD (Índice de reducción de dosis) por ecuación de Chou Talalay para la combinación de FRAX-1036/KN93 en un cultivo primario de cáncer de mama.

tras 16 horas de tratamiento individual o combinado se cuantifico la actividad de las caspasas 3/7 (Figura 41), observando que cuando se utiliza FRAX-1036 existe un repunte significativo en la actividad de las caspasas pero únicamente en las líneas SK-BR-3 y MDA-MB-231 indicando un efecto de droga citotóxica como previamente ha sido reportado ¹²⁵. Para el caso de KN93 solo se observo un aumento significativo en la línea triple negativo MDA-MB-231 este efecto también ya ha sido reportado en el cual KN93 tiene como efecto un retraso en la progresión del ciclo celular más que un mecanismo de apoptosis ¹²⁶. Como se esperaba, en el caso de la utilización de drogas combinadas se observo un aumento dramático en la actividad de las caspasas en todas las líneas celulares de cáncer de mama en comparación con el control, siendo la línea SK-BR-3 y MDA-MB-231 las que reportaron mayor actividad

de caspasas y por lo tanto mayor tasa de apoptosis. Estos resultados fueron corroborados en un cultivo primario de cáncer de mama triple negativo, observando el mismo de patrón de actividad de caspasa 3/7 que la línea celular MDA-MB-231 (Figura 42). En conclusión, todos estos resultados nos sugieren que FRAX-1036 tiene un efecto citotóxico el cual es potenciado cuando se combina con KN93, y este

efecto es selectivo para las líneas celulares de cáncer de mama, así como en un

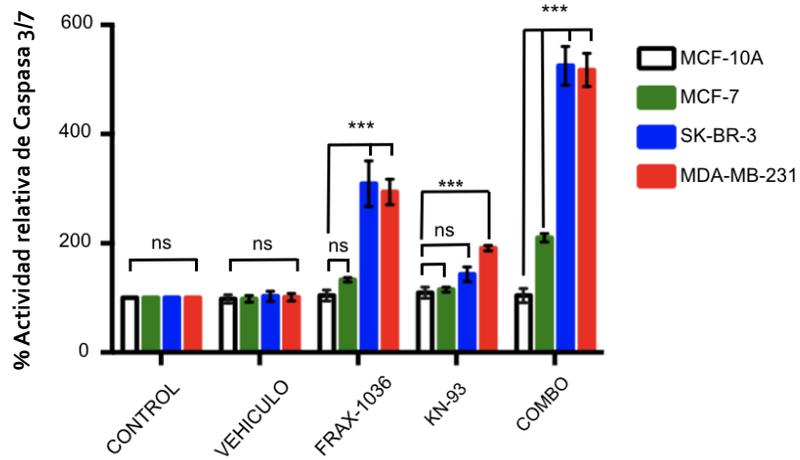


Figura 41. Efecto de la combinación de FRAX-1036 y KN93 sobre la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama.

cultivo primario de cáncer de mama triple negativo.

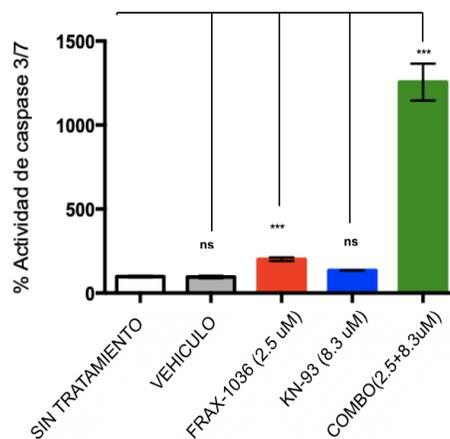


Figura 42. Efecto de la combinación de FRAX-1036 y KN93 sobre la apoptosis en un cultivo primario de cáncer de mama.

6.11 EFECTO DE LA INHIBICIÓN FARMACOLOGICA INDIVIDUAL O COMBINADA DE PAK Y CAMKII SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR.

Debido a que Pak1 y CaMKII regulan positivamente la migración e invasión celular analizamos si la utilización de los inhibidores farmacológicos de forma individual o combinada tienen efectos potenciales sobre estos procesos celulares aunado a su ya observada capacidad citotóxica. Para evaluar el efecto sobre la migración celular utilizamos 3 estrategias experimentales, en primer lugar, un ensayo convencional de cierre herida, el cual consiste en observar el comportamiento de una monocapa confluyente de células con alta capacidad migratoria a la que se le ha realizado una herida, las cuales se cuantificara su capacidad de desplazarse para cerrar la herida y generar contacto célula-célula. Para lo cual utilizamos una monocapa de la línea celular MDA-MB-231 la cual cuenta con una alta capacidad migratoria, además de

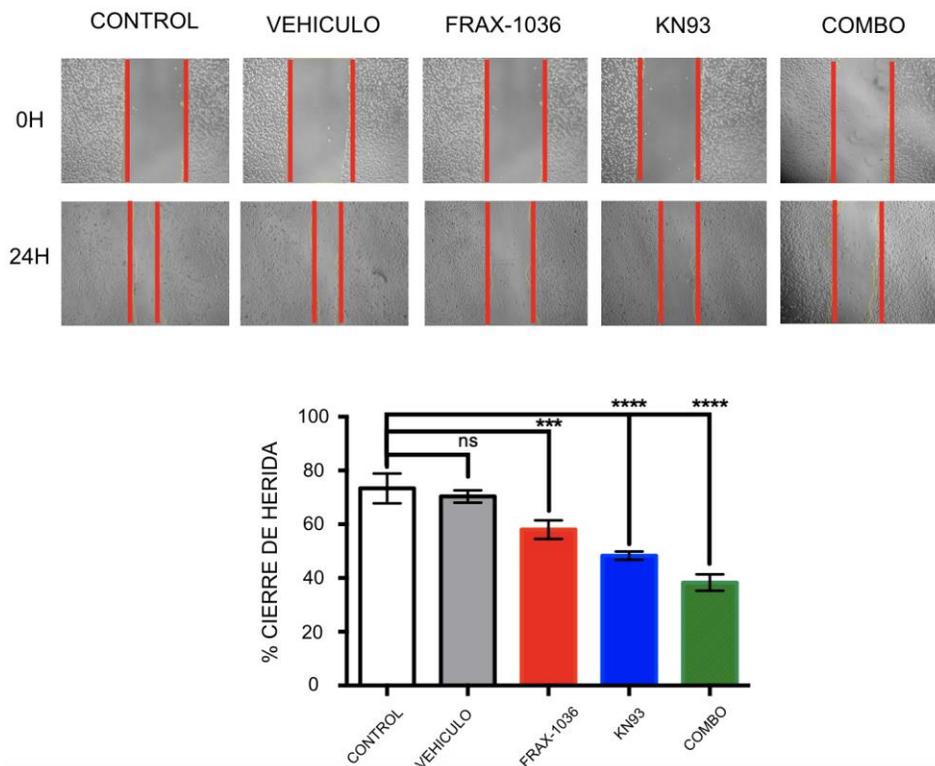


Figura 43. Resultados de los ensayos de cierre de herida en la línea celular MDA-MB-231 tratadas con FRAX-1036 y/o KN93.

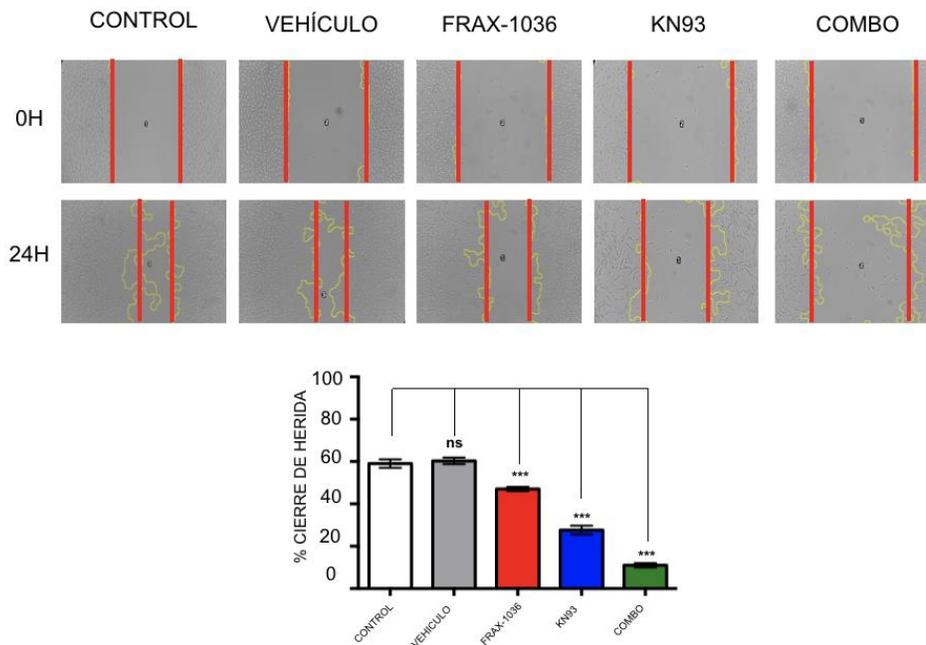


Figura 44. Resultados de los ensayos de cierre de herida un cultivo primario de cáncer de mama tratadas con FRAX-1036 y/o KN93.

que este subtipo molecular (triple negativo) se caracteriza por ser altamente metastásico. 24h después de haberse realizado la herida se cuantifico el porcentaje de cierre de herida, encontrándose que la combinación de los inhibidores farmacológicos (FRAX-1036 y KN93) disminuía significativamente su capacidad migratoria contra el control y el vehículo (~80% vs ~40%) (Figura 43) el mismo efecto fue observado en un cultivo primario de cáncer de mama triple negativo (~60% vs ~15%) (Figura 44).

Al realizar los ensayos de cierre de herida, las células no solo están migrando también están proliferando por lo que los resultados observados son una mezcla de los efectos de la inhibición de la migración, pero también retrasos en el ciclo celular, por lo cual como segunda técnica llevamos a cabo experimentos de tiempo real, tomando imágenes de las células en el proceso de migración aleatoria cada 5 min por 16 horas y discernir entre proliferación y migración celular, este método nos permite cuantificar la velocidad y la distancia acumulada de migración, así como el

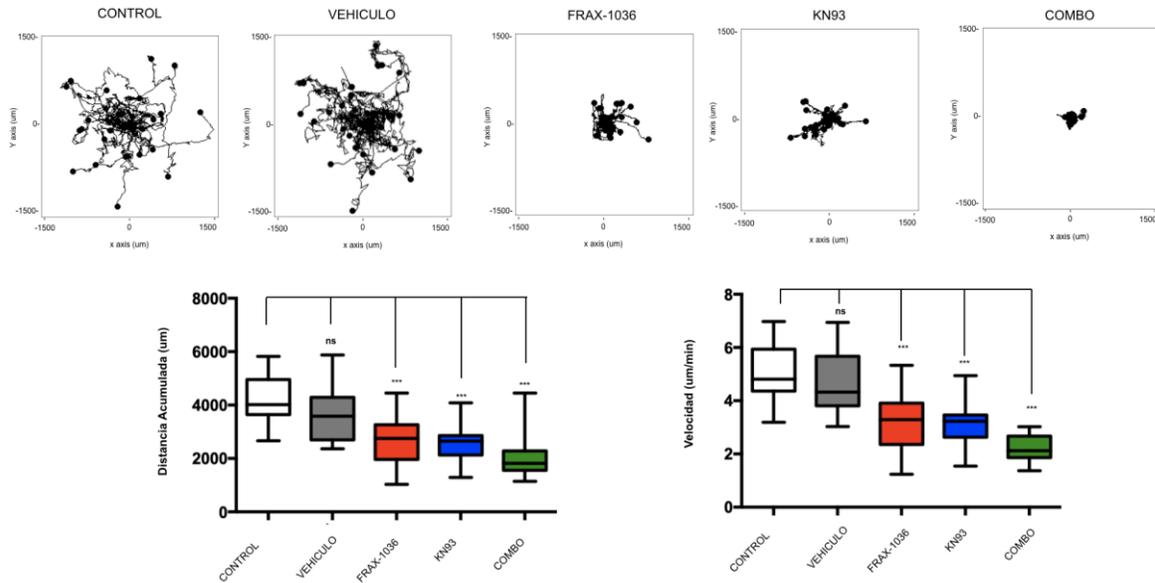


Figura 45. La combinación de FRAX-1036 y KN93 reducen la distancia acumulada y la velocidad en un cultivo primario de cáncer de mama.

patrón de movimiento celular. Como esperábamos la línea celular MDA-MB-231 tratada con la combinación de fármacos disminuyó la distancia acumulada ($9.58\mu\text{m}$ vs $72.38\mu\text{m}$) y la velocidad migratoria ($0.01\mu\text{m}/\text{min}$ vs $0.075\mu\text{m}/\text{min}$) significativamente comparado con el grupo control (Figura 45). El mismo efecto fue observado en un cultivo primario de cáncer de mama triple negativo, con una distancia acumulada de $1979\mu\text{m}$ vs $4189\mu\text{m}$ y una velocidad de $2.1\mu\text{m}/\text{min}$ y $5.01\mu\text{m}/\text{min}$ contra el control respectivamente (Figura 46). Estos resultados nos indicaban que efectivamente el uso del combo terapéutico disminuye la tasa de migración celular y no era un efecto empalmado sobre la proliferación celular. Finalmente, como tercera técnica retamos a los inhibidores farmacológicos a bloquear la migración por quimiotaxis estimulada con suero fetal bovino para esto realizamos ensayos de tipo Transwell con la línea celular MDA-MB-231 (Figura 47) y con el cultivo primario de cáncer de mama triple negativo (Figura 48). Como esperábamos el combo farmacológico disminuyó el porcentaje de células con capacidad migratoria (-51%) y sorpresivamente en el cultivo primario triple negativo el con la combinación de fármacos tuvo una supresión dramática de la migración celular (-80%) comparado con el control sin tratamiento. Finalmente, para que un

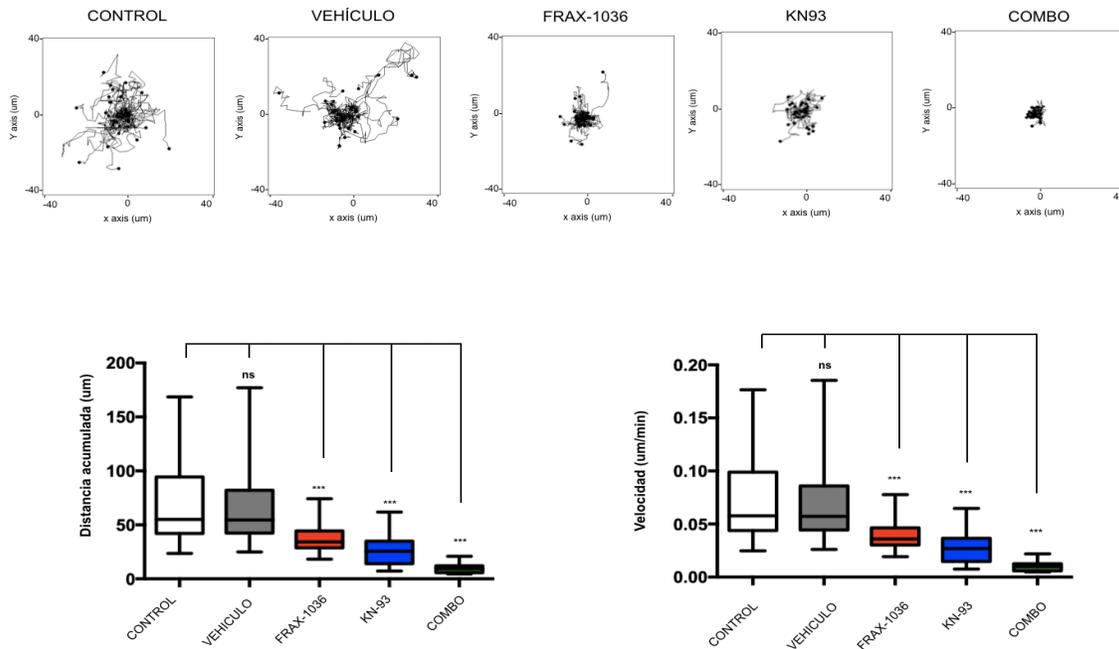


Figura 46. La combinación de FRAX-1036 y KN93 reducen la distancia acumulada y velocidad de la línea celular MDA-MB-231.

tumor se disemine y forme un tumor secundario, requiere que las células tumorales tengan la capacidad de invasión el cual se define como la capacidad de migración y penetración directa de las células a tejidos y/u órganos adyacentes. Por lo que llevamos a cabo ensayos de degradación de gelatina fluorescente para evaluar la inhibición de la capacidad invasiva de las líneas celulares MDA-MB-231 y MBCDF-B4 ya que anteriormente habíamos demostrado que la inhibición de Pak1 y/o CaMKII afecta negativamente la capacidad migratoria. En la figura 49 podemos observar como la inhibición farmacológica combinada tanto de Pak1 y de CaMKII abate el porcentaje de células con capacidad invasiva en un 50% en el grupo control vs un 20% del empleando la combinación de fármacos. Por lo que todos estos datos juntos demostraron que la inhibición dual del eje Pak1/CaMKII bloquea la migración e invasión celular en la línea celular MDA-MB-231 y en el cultivo primario MBCDF-B4.

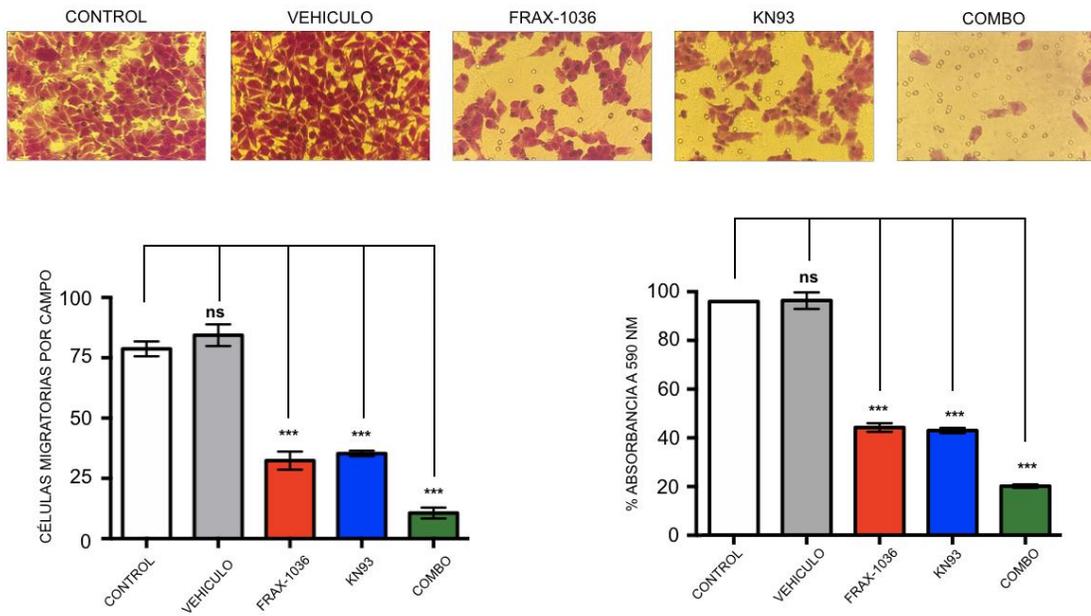


Figura 48. El combo farmacológico de FRAX-1036 y KN93 inhibe la migración celular en un cultivo primario de cáncer de mama triple negativo.

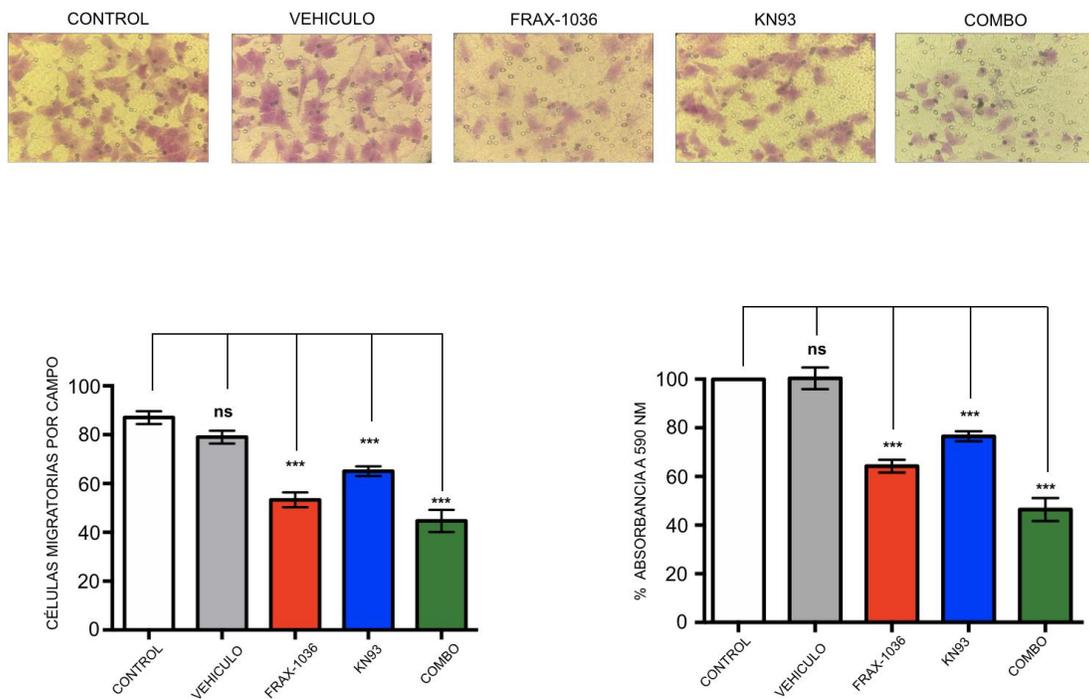


Figura 49. El combo farmacológico de FRAX-1036 y KN93 inhibe la migración celular en la línea celular MDA-MB-231.

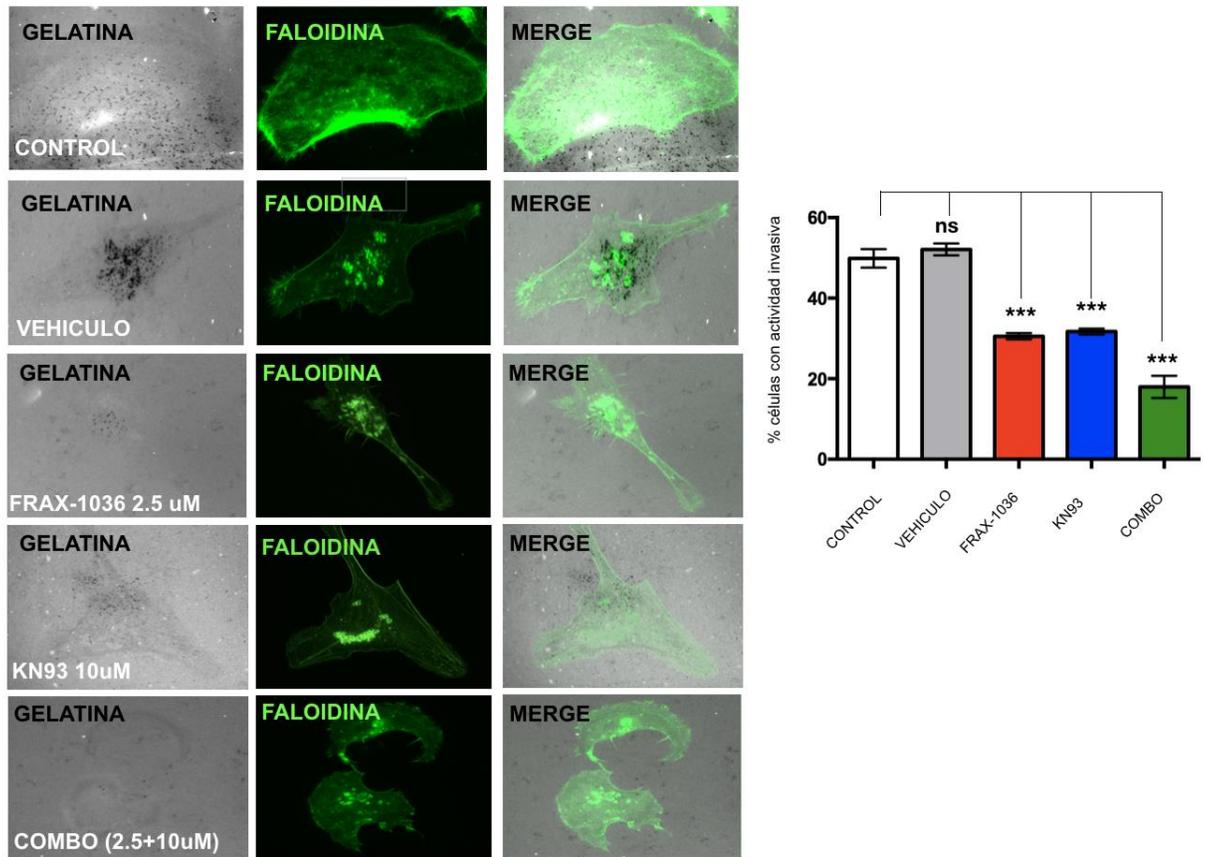


Figura 49. El combo farmacológico de FRAX-1036 y KN93 inhibe la migración celular en un cultivo primario de cáncer de mama triple negativo.

6.12 LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA INDIVIDUAL O COMBINADA DE PAK Y CAMKII DISMINUYE LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN DE LA GTPASA PEQUEÑA RHOA.

Dentro de las vías de señalización compartidas y activadas por Pak1 y CaMKII que involucran los procesos de migración celulares se encuentra las GTPasas de la familia Rho, en particular RhoA, la cual ha sido demostrado por varios autores que es activada por Pak1 y CaMKII reportado de manera independiente pero nunca como parte de un axis como Pak1 y CaMKII ^{174,175}. Por lo que entonces decidimos

averiguar si la pérdida de la capacidad migratoria al inhibir farmacológicamente Pak1 y CaMKII se debía a una disminución en la actividad de RhoA. Para esto, llevamos a cabo experimentos de G-ELISA RhoA en la línea celular MDA-MB-231, tras 4 horas con los inhibidores y posterior estimulación de las células con LPA, observamos que efectivamente el combo farmacológico disminuye la activación de RhoA al 37% (Figura 53). Este resultado sugiere que la disminución de la migración celular observada con los tratamientos farmacológicos se debe en parte a una disminución en la activación de la GTPasa RhoA.

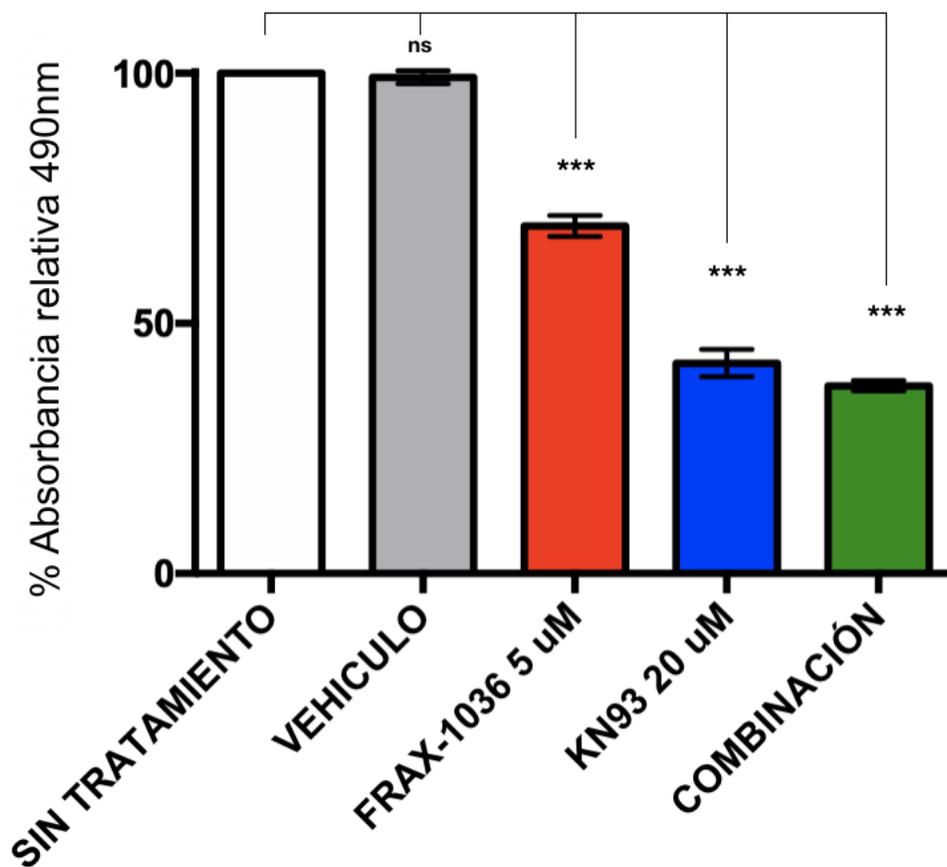


Figura 50. El combo de Frax-1036 y KN93 reducen la activación de RhoA en la línea celular MDA-MB-231

6.13 LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA COMBINADA DE PAK1 Y CAMKII RETRASA EL CRECIMIENTO TUMORAL EN UN MODELO DE XENOTRANSPLANTE ORTOTÓPICO

A continuación, probamos el efecto de los inhibidores contra PAK1/CaMKII sobre el crecimiento de xenoinjertos de la línea celular MDA-MB-231, ya que la más sensible a la inhibición farmacológica de Pak1 y CaMKII además de ser triple negativo y no cuenta con un tratamiento específico. Se inyectaron 500,000 células MDA-MB-231 en ratones atímicos Nu/J nu/nu hembras de 6 semanas de vida, en la glándula mamaria abdominal izquierda y se permitió el crecimiento tumoral por 15 días o hasta que alcanzarán un tamaño de 100mm³. A continuación los ratones se trataron con vehículo, inhibidor de Pak FRAX-1036 (vía oral 25mg/kg/24h), inhibidor de CaMKII KN93 (vía intraperitoneal 1mg/Kg/24h) o combinación por 9 días o hasta que alcanzaron un tamaño máximo tumoral de 2000mm³. Los volúmenes de los tumores se evaluaron cada 24 horas hasta que alcanzaron el tamaño deseado para posteriormente realizar la eutanasia. Como se aprecia en la figura 51A, los tratamientos individuales o combinados no tuvieron ningún efecto negativo sobre el peso del ratón durante los tratamientos. El análisis del crecimiento tumoral de los animales demostró una tasa de crecimiento tumoral significativamente más lenta en los ratones tratados con FRAX-1036 y KN93 comparación con el grupo vehículo. Sin embargo, el tratamiento combinado tuvo un efecto más marcado generando tumores 50-75% más pequeños que el grupo vehículo (Figura 51 B-D). Posterior a la eutanasia los tumores fueron fijados en Formol 4%-PBS por 48 horas y analizados por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-Pak1, anti-CaMKII, anti PCNA (marcador de proliferación) y anti-Caspasa 3 procesada (marcador de apoptosis). Los resultados de las IHC mostraron que el tratamiento combinado aumento los niveles de Pak1 tal como se observo en los experimentos de western-blot (Figura 52 primer panel), como se esperaba los diferentes tratamientos no impactaron en los niveles de CaMKII (Figura 52 segundo panel). El análisis de los marcadores de proliferación (Figura 52 tercer panel) y apoptosis (Figura 52 cuarto panel) mostró

que el tratamiento con FRAX-1036 no tuvo efecto sobre la proliferación celular, pero si un aumento significativo de la apoptosis, mientras que el tratamiento con KN-93 no impacto sobre la proliferación ni apoptosis, acorde a lo reportado que KN-93 tiene un efecto citostático al prolongar la transición de metafase a anafase. Cuando se coadministraron, los inhibidores bloquearon significativamente la proliferación y causaron apoptosis y zonas de necrosis.

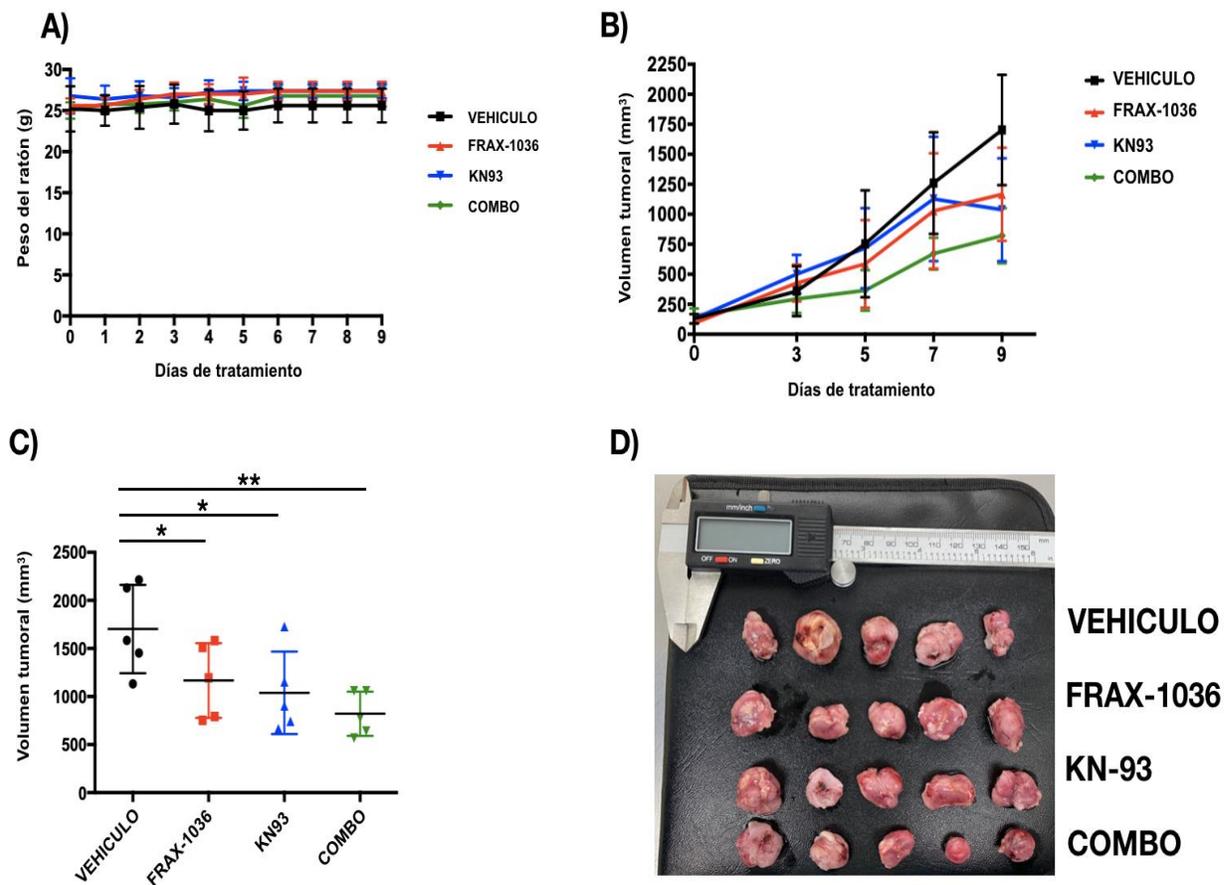


Figura 51. La inhibición farmacológica combinada de Pak y CaMKII retrasan la tumorigenicidad de células de cáncer de mama triple negativo en un modelo murino.

Estos resultados demuestran que la combinación de FRAX-1036 y KN-93 tiene una actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica significativa contra las células de cáncer de mama triple negativo *in vivo*.

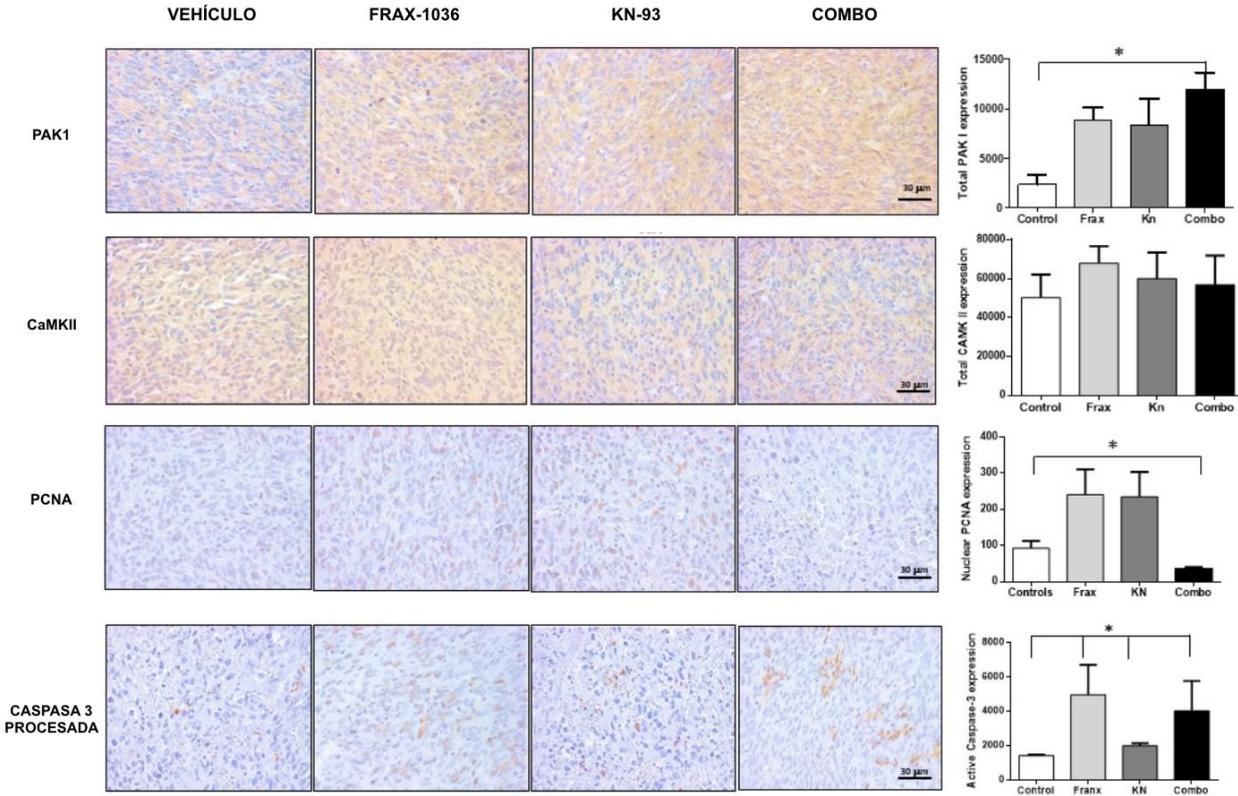


Figura 52. La inhibición farmacológica combinada de Pak y CaMKII disminuye la tasa de proliferación celular y aumenta la tasa de apoptosis.

7. DISCUSIÓN

En México, el cáncer de mama afecta a más de 30,000 mujeres por año, y ocupa el primer lugar en mortalidad por tumores malignos en esta población ¹²⁷. La alta tasa de mortalidad en México en comparación con países de primer mundo se debe a una falta de autodetección, una pobre educación sanitaria y una incipiente accesibilidad a diagnósticos y tratamientos oportunos y específicos. Todo esto debido en parte a una baja cultura de prevención en cáncer y una pobre disponibilidad de recursos médicos y tecnológicos en nuestros hospitales mexicanos. El cáncer de mama cuenta una alta heterogeneidad intratumoral, lo cual refleja una amplia complejidad molecular. Los perfiles de expresión génica han permitido la reclasificación del cáncer de mama en al menos 4 grandes subtipos: luminal A, luminal B, HER2+ y triple negativo¹²⁸. Este último, aunque representa el menor porcentaje (<10%) de todos los tumores malignos de mama, es altamente agresivo y tiene el peor pronóstico de supervivencia, desafortunadamente a diferencia del resto de los subtipos moleculares, no cuenta con un tratamiento específico, lo cual lo hace de alto interés en el campo de investigación médica.

Dentro de las proteínas oncogénicas descritas en cáncer, la cinasa Pak1 ha tomado gran relevancia ya que un número creciente de reportes indican que tiene un papel importante en el desarrollo y progresión de distintos tipos de cáncer, y es particularmente importante para el desarrollo de cáncer de mama y ovario, ya que en aproximadamente 30% de estos tumores se encuentra amplificado el *locus* genético en el cuál se localiza el gen que la codifica ¹²⁹. Pak1 se encuentra amplificado y/o hiperactivo en cerca del 50% de los tumores de cáncer de mama, y sus niveles de expresión correlacionan con un incremento de la invasividad tumoral, resistencia a tratamientos endocrinos y un mal pronóstico que incluye una reducción de la supervivencia general y libre de enfermedad ¹³⁰. La evidencia sugiere que los tumores que sobreexpresan Pak1 son adictos a las vías de señalización reguladas por esta cinasa, ya que son altamente sensibles a la inhibición de su actividad. Son múltiples los blancos de fosforilación de esta cinasa, los cuales orquesta positivamente para controlar vías de proliferación y crecimiento, como la vía clásica

de las MAPK y la vía de PI3K/Akt/mTOR. Sin embargo, aún son desconocidos muchos sustratos directos e indirectos de Pak1. Un abordaje experimental para dilucidar nuevas proteínas reguladas por Pak1 fue realizado por el grupo de Chernoff y colaboradores (2013), en el cual utilizando un microarreglo de fosfoanticuerpos con extractos proteicos de células de cáncer de mama silvestres o deficientes de la cinasa Pak1 se logró identificar múltiples sustratos bien caracterizados de esta cinasa como RAF, BAD y β -catenina, así como de otras proteínas que pudiesen ser sustratos directos o indirectos de Pak1, entre los que se encuentran JAK2, VAV1 y CaMKII. La importancia de conocer nuevos sustratos de Pak1 se ejemplifica en β -catenina, la cual es fosforilada por Pak1 en la S675 (fenómeno previamente descrito en cáncer de colon), esta fosforilación de β -catenina provoca un escape de la degradación por la vía proteosomal, estabilizándola y permitiendo su translocación al núcleo donde forma un complejo con TCF/LEF promoviendo la transcripción de la ciclina-D1 y de c-Myc. Bajo esta observación se llevaron a cabo experimentos *in vivo* de xenotransplante de células de cáncer de mama las cuales mostraron regresión tumoral cuando se trataron con inhibidores farmacológicos combinados de Pak y β -catenina, quedando en evidencia que la búsqueda y bloqueo farmacológico dual de ejes de señalización son efectivos en el tratamiento del cáncer de mama humano ^{131, 132}. Sin embargo, los mecanismos moleculares que explican la contribución de Pak1 y sus sustratos a la carcinogénesis de mama no se comprenden completamente. Dentro de las proteínas que se observaron hipofosforiladas por el grupo de Chernoff y que no habían sido descritas como blancos de Pak1 se encuentra la cinasa CaMKII la cual se ha asociado recientemente al proceso de transformación celular ¹³³.

En este estudio, identificamos un nuevo eje de señalización Pak1/CaMKII en cáncer de mama humano triple negativo el cual de acuerdo con nuestras observaciones está involucrado en la proliferación, migración e invasión tumoral a través de la activación de la GTPasa RhoA. Además, la inhibición farmacológica combinada dio como resultado una reducción de la proliferación, migración e invasión tumoral, así como un retraso significativo en el crecimiento del tumor en un modelo murino de

cáncer de mama. Este hallazgo fue comprobado bajo 4 modelos experimentales: *in silico*, *in vitro*, *in cellulo* y finalmente *in vivo*.

Los ensayos *in silico* de predicción de sustratos de fosforilación por cinasas (*Software GPS 3.0*) mostraron que los residuos T277 y T287 de CaMKII podrían ser blanco de fosforilación por Pak1. Este primer indicio fue importante porque previamente ha sido descrito que la autofosforilación de la T287 de CaMKII (dependiente de calcio/calmodulina) permite su activación enzimática controlando procesos de proliferación, migración e invasión celular, sin embargo, no ha sido reportado que otra cinasa fosforile en "*trans*" a este residuo y por lo tanto regule su actividad ¹³⁴. Para el caso de la T277, no ha sido reportado que es fosforilado intrínseca o extrínsecamente, siendo un nuevo posible sitio de fosforilación con funciones aún desconocidas. Adicionalmente, estudios de modelado por homología *in silico* y de acoplamiento molecular o "*docking*", reforzaron esta hipótesis, ya que los complejos del dominio catalítico Pak1 con los péptidos que contienen a la T277 y T287 fosforilada, indicaron que la probabilidad de fosforilación del residuo T287 es mayor que la T277. Este resultado fue confirmado mediante experimentos de dinámica molecular de los complejos péptido-proteína y de proteína-proteína y que a su vez nos conduce a un enfoque más realista de la estructura de los complejos, ya que implica la presencia de disolvente y posibles cambios a lo largo del tiempo. Paradójicamente los resultados del acoplamiento molecular proteína-proteína con CaMKII en su forma inhibida mostraron que la T277 está lo suficientemente expuesta para ser fosforilado por Pak1, sin embargo, para la fosforilación de T287, este aminoácido está "oculto" dentro de una hélice α que dificulta el acceso al sitio activo de Pak1. Interesantemente las simulaciones de dinámica molecular mostraron que los complejos presentan una alta flexibilidad. Aunque es poco probable que Pak1 fosforile a la T277 y T287 en su estado autoinhibido, es plausible que si suceda cuando el complejo calcio/calmodulina se una al dominio de regulación ya que se ha reportado que la hélice α donde se encuentran estos residuos (T277 y T287) se despliega cuando el complejo calcio/calmodulina se une al dominio de regulación de CaMKII ¹³⁵.

En contraste al modelo clásico, donde el complejo calcio/calmodulina se une al dominio de regulación, provocando la liberación del dominio de cinasa para realizar una primera autofosforilación en la T287 activando un efecto tipo domino. Nuestros resultados *in silico* sugieren que podría existir un mecanismo alternativo en el cual una vez que se une el complejo calcio/calmodulina al dominio de regulación, este realiza un cambio conformacional dejando accesible al residuo T277 siendo fosforilado por Pak1 y posteriormente la T287. Siendo entonces la primera vez que se reporta un posible mecanismo de activación serial. Sin embargo, esto necesita corroborarse experimentalmente por utilizar un inhibidor de calmodulina (W-7) y una sobreexpresión de Pak1 constitutivamente activa. La inhibición de la unión del complejo calcio/calmodulina a CaMKII dejaría inaccesible el dominio de regulación y por lo tanto la inactivación de la cinasa aun cuando tengamos una sobreexpresión e hiperactividad de Pak1.

Posteriormente, nuestros experimentos de cinasa *in vitro* confirmaron que Pak1 fosforila el dominio de regulación de CaMKII. Interesantemente, la doble mutante (T277/287A) no mostró señales de fosforilación, lo cual nos indicaba que efectivamente solo existen dos sitios de fosforilación por la cinasa Pak1. Nuevamente, este resultado debe ser confirmado *in cellulo* a través de un análisis de fosforilación por espectrometría de masas, inmunoprecipitando a CaMKII en presencia o ausencia de Pak1, este resultado nos permitiría conocer todos los residuos fosforilados por Pak1 en un contexto celular y confirmaría los resultados obtenidos *in silico* e *in vitro*.

Aunque los estudios *in silico* e *in vitro* intentan simular las condiciones fisiológicas para estudiar los mecanismos involucrados en fenómenos biológicos, estos solo nos muestran parcialmente los procesos observados por lo cual su extrapolación tiende a llevar a interpretaciones erróneas. Para verificar que efectivamente lo observado en nuestros ensayos *in silico* e *in vitro* sucediera en un contexto celular que permitieran comprobar que efectivamente Pak1 fosforila directamente a CaMKII *in cellulo* en cáncer de mama.

Primeramente, utilizamos un “*pool*” de siRNAs dirigidos específicamente contra el mRNA de Pak1 con el propósito de abatir su expresión proteica, observando una hipofosforilación de CaMKII. Aunque la actividad enzimática de Pak1 es la más importante en la regulación de vías de señalización también se ha reportado que puede funcionar como una proteína de andamiaje y a su vez regular diversas vías de señalización. Como ha sido reportado para PDK1/ Akt, en el cual el dominio de cinasa de Pak1 funciona como andamio para PDK1 el cual a su vez estimula a Akt facilitando su translocación a la membrana plasmática ¹³⁶.

Por lo que tomando en cuenta este antecedente existía la posibilidad de que la hipofosforilación de CaMKII se debiera a la pérdida de su función de andamiaje y no de su actividad catalítica, por lo cual se inhibió la actividad de cinasa con la molécula pequeña FRAX-1036 (el cual es un selectivo y potente inhibidor de las cinasas Pak con una potencia bioquímica (Ki) de 23.3 nM contra Pak1 sienta tan selectivo que incluso se necesitan 3 veces la dosis (72.4 nM) para bloquear a Pak2 ¹³⁷, estos resultados seguían apoyando que Pak1 fosforila directamente a CaMKII. Interesantemente observamos que la inhibición farmacológica aumentó los niveles de expresión de Pak1, datos contrarios a los observamos con el inhibidor de la misma familia FRAX-597, el cual da como resultado una reducción en los niveles totales de Pak1, efecto anulado cuando las células se tratan con MG132 un inhibidor del proteosoma, en este caso FRAX-597 funciona no solo como un inhibidor competitivo de ATP sino también como un agente desestabilizador de Pak¹³⁸, en nuestro caso este fenómeno no fue exclusivo de nuestro modelo si no que también fue observado por Prudnikova y colaboradores (2015), donde se evaluó el efecto de FRAX-1036 en líneas celulares de cáncer de ovario ¹³⁹. Este fenómeno pudiera ser consecuencia de un efecto compensatorio como resultado de eliminar la actividad catalítica de Pak1, como el que se observa cuando se inhibe farmacológicamente la vía PI3K ¹⁴⁰. Finalmente, para corroborar que efectivamente Pak1 fosforila directamente a CaMKII utilizamos un sistema de activación inducible de Pak1 con Rapamicina, en la línea HEK293T, la cual presenta bajos niveles de Pak1 y CaMKII en comparación a las líneas de cáncer de mama, de tal forma que la activación con rapamicina nos permitió observar una clara hiperfosforilación de CaMKII por Pak1

contrario a si este sistema se utilizará en una línea celular que sobreexpresa ambas cinasas, donde se generaría un efecto competitivo. Lamentablemente al no existir anticuerpos que detectan la fosforilación de la T277, no pudimos confirmar que este residuo es fosforilado directamente por Pak1 *in cellulo*, pero de acuerdo con los resultados previos, la fosforilación de la T277 tendría el papel de realizar un cambio conformacional para que la T287 sea accesible para su fosforilación por Pak1. Como se ha mencionado anteriormente, la función de la fosforilación de la T277 es desconocida, por lo que una estrategia experimental que nos permita dilucidar el posible mecanismo biológico de esta fosforilación es realizar un *knock-in* con el sistema CRISPR-Cas9 realizando un cambio de la T277 por alanina el cual funcionaria como un “fosfo null” en células de cáncer de mama para posteriormente analizar el estado de activación de CaMKII, sus substratos rio abajo, la tasa de migración, invasión y ciclo celular ya que CaMKII participa sobre estos procesos biológicos.

Previamente ha sido reportado que los altos niveles de expresión de Pak1 en cáncer de mama correlacionan con una pobre supervivencia y una alta probabilidad de presentar metástasis ¹⁴¹. Por lo cual en este trabajo decidimos utilizar líneas celulares de cáncer de mama de los diferentes subtipos moleculares, con el fin de determinar si la sobreexpresión de Pak1 y CaMKII se presenta en un subtipo específico. Los experimentos de western-blot en líneas celulares de cáncer de mama y en un cultivo primario subtipo triple negativo, donde el subtipo triple negativo presentó los mayores niveles de expresión de Pak1 y CaMKII, quedando la pregunta si existe un mecanismo de retroalimentación positiva, donde Pak1 regule factores de transcripción o co-activadores que sobreexpresen a CaMKII, o viceversa ya que existe evidencia de que CaMKII regula la transcripción de genes a través de la fosforilación de HDAC4 promoviendo su exportación nuclear y su posterior secuestro en el citoplasma a través del transportador 14-3-3 que a su vez también es fosforilado y activado por CaMKII ¹⁴².

Además, este trabajo se convierte en el primer reporte en demostrar que existe una sobreexpresión de Pak1 y CaMKII y que los niveles de expresión de ambas

proteínas son directamente proporcionales al grado de agresividad del tumor. Sin embargo, los datos obtenidos con las líneas celulares no siempre se pueden extrapolar a lo que sucede en muestras de cáncer de mama humano por lo que entonces procedimos a emplear microarreglos que contiene muestras de biopsias de pacientes con los diferentes subtipos moleculares. Nuevamente observamos en muestras de biopsias de pacientes con cáncer de mama una correlación entre la mayor expresión de Pak1 y CaMKII y el grado de agresividad del tumor como fue evidente en el subtipo triple negativo. Mientras que, en biopsias de cáncer de mama del subtipo HER2+ (SK-BR-3), no se observó una sobreexpresión significativa de Pak1, lo que indica que existe una alta heterogeneidad tumoral. Para explicar este resultado sugerimos que las biopsias de tumores de cáncer de mama del subtipo HER2+ no presentaron una sobreexpresión significativa de Pak1 debido a que estos tumores son adictos a la vía de señalización de HER2, por lo que podrían no dependen exclusivamente de la actividad de Pak1 como orquestador maestro, ya que se apoyan en oncoproteínas con igual importancia como la vía de las cinasas Src ¹⁴³, la vía de PI3K ¹⁴⁴, las vías activada por RAS ¹⁴⁵, y las vías dependiente de PKC ¹⁴⁶. En conclusión, nosotros proponemos en baso a los niveles de expresión de ambas proteínas presente en biopsias de pacientes con cáncer de mama que estas dos proteínas pudieran ser biomarcadores de mal pronóstico ya que se observó una alta expresión en tumores de alto grado.

Existe evidencia científica que demuestra que el bloqueo dual de un eje de señalización tiene efecto sinérgico, mayor eficacia, menor toxicidad y, al menos, retraso en la aparición de la resistencia adquirida al tratamiento ¹⁴⁷. Por lo que en base a los hallazgos de este trabajo quisimos averiguar si este nuevo eje de señalización Pak1/CaMKII podría ser un blanco terapéutico para el cáncer de mama triple negativo. Encontrando que el bloqueo farmacológico de Pak1 y CaMKII tienen un gran efecto sobre líneas celulares de cáncer de mama con sobreexpresión de estas cinasas. Además de manera importante encontramos que la línea triple negativo MDA-MB-231 quién presentaba mayores niveles de ambas proteínas también fue la más susceptible a ambas drogas, las cuales no fueron letales en las células no transformadas, sugiriendo que la inhibición dual es específica para

células cancerígenas y de manera muy importante era más efectiva en la triple negativa. Este resultado fue comprobado en los experimentos de evaluación de la actividad de las caspasas 3 y 7, donde la mayor inducción de la apoptosis se observó en células triple negativas en comparación con los otros subtipos moleculares como el luminal B y el HER2+, y algunos informes sugieren que la inhibición combinada de Pak1 y algunos otros oncogenes relevantes como BCR-ABL1, Akt, β -catenina y Aurora A podrían ser útiles para tratar cánceres provocados por oncogenes para los que se cree que Pak1 es un elemento de señalización obligado ^{148,149,150,151}.

El encontrar un efecto sinérgico, no tóxico para células no transformadas y una favorable reducción de la dosis en células de cáncer de mama triple negativo es un gran hallazgo ya que este subtipo es un gran desafío para los médicos debido al pésimo pronóstico, la falta de terapias dirigidas y la alta mortalidad en comparación con otros subtipos de cáncer de mama, haciendo de estos inhibidores un posible mecanismo de intervención farmacológica para pacientes con este subtipo tumoral. Esto es relevante ya que, hasta ahora, existen pocos estudios sobre el papel de Pak1 en cáncer de mama triple negativo. Por ejemplo, Hahn y colaboradores (2011), observaron que el silenciamiento de Pak1 en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo comprometió el crecimiento independiente de anclaje, pero en líneas celulares HER2+, la supresión de Pak1 no logró afectar el crecimiento independiente de anclaje ¹⁵². Por otro lado, Shi y colaboradores (2021) describieron que la vía de señalización Pak1/LIMK/Cofilina promueve la migración celular a través del eje esfingosina cinasa 2/esfingosina fosfato 1 (SphK2/S1P) ¹⁵³. Cummings y colaboradores (2020), a través de liposomas sensibles a la fosfolipasa secretoria cargados de IPA-3, un inhibidor alostérico de las Paks del grupo I (SPR—IPA3) bloquearon la actividad de Pak1 en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, mostrando una mayor inducción de apoptosis ¹⁵⁴.

Considerando, los excelentes resultados de la inhibición farmacológica observada en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo esperábamos obtener resultados similares en el modelo murino de cáncer de este subtipo. Nuestros

resultados sugieren que este tratamiento no es tóxico ya que durante todo el experimento los ratones no presentaron alteraciones en el comportamiento, ni en el examen físico, ni una reducción del peso, además de no producir mortalidad en ningún grupo experimental, siendo el primer objetivo de las fases preclínicas.

Sin embargo, y contrario a lo observado en los cultivos celulares, la terapia dual solo mostró un retraso significativo en el crecimiento del tumor cuando se co-administraron inhibidores farmacológicos de Pak1 y CaMKII, por lo que para explicar estos resultados proponemos lo siguiente. En el caso de KN93, la vía de administración que nosotros utilizamos fue diferente a los previamente reportado por Zayzafoon y colabores (2017) cuya administración de KN93 fue intraósea ya que ellos utilizaron un modelo de osteosarcoma por lo que fue factible el empleo de esta vía de administración lo que condujo a que hubiera una reducción significativa del crecimiento del tumor intratibial. Sin embargo, para el modelo que empleamos la vía más accesible era la intraperitoneal, y creemos que esto pudo impactar en el que nosotros solo observáramos un retraso en el crecimiento ¹⁵⁵. Por otro lado, Jin y colaboradores (2020), encontraron que la aplicación *in vivo* de KN93 tiene una captación intracelular ineficaz y un tiempo de circulación corto, por lo cual ellos diseñaron un hidrogel con melitina cargados de KN93 que fue utilizado en el modelo murino con melanoma observando una drástica reducción de los tumores tratados con este hidrogel comparado con dosis convencionales ¹⁵⁶. En contraste en nuestros experimentos nosotros administramos KN93 sin que estuvieran acoplados o conjugados con otra molécula que nos permitiera llegar a su órgano blanco o que la estabilizara lo cual podría haber hecho más efectiva la administración de esta droga. Por lo que todo esto sugiere que la vía de administración juega un papel muy importante en la efectividad del tratamiento. Otra cosa que pudo influir en nuestros resultados es que al no existir estudios de farmacodinamia (mecanismos de acción del fármaco, la posible relación con dosis y respuesta clínica) de farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo, excreción del fármaco y sus posibles interacciones con otros medicamentos) pudimos haber usado una vía y dosis que no fuera la más apropiada.

En el caso de FRAX-1036, son muy pocos los estudios en donde se ha utilizado esta droga por vía oral en un modelo murino, uno de ellos es el realizado por Shagisultanova y colaboradores (2019) en el cual utilizaron a FRAX-1036 y Alisertib (inhibidor de Aurora A) en un modelo de cáncer de mama ortotópico. Ellos observaron un efecto sinérgico combinado sin embargo el efecto fue mayoritariamente por alisertib más que por FRAX-1036 ¹⁵⁷. Por lo que nuevamente, aunque FRAX-1036 es un potente inhibidor in vitro, demostrado en una decena de estudios con diferentes tipos de tumores ^{158,159,160}, hacen falta diversos estudios de farmacología que evalúen la efectividad en modelos animales.

Aún así los resultados obtenidos a partir de los tumores de los ratones tratados con ambas drogas por la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-PCNA (marcador de proliferación) y anti-caspasa 3 procesada (marcador de apoptosis) mostraron un aumento de la apoptosis con amplias zonas de necrosis y una disminución de la proliferación celular, *ad hoc* a lo observado en nuestros resultados en líneas celulares. Por lo que entonces esto sugeriría que parcialmente las drogas están actuando sobre el tumor, lo cual podría deberse a como lo habíamos mencionado anteriormente la dosis que llega al sitio blanco no sea suficientes para tener resultados similares a los observados en líneas celulares. Otra posibilidad del contraste de efectos entre líneas celulares y el modelo murino es que las células tumorales hayan desarrollado mecanismos de resistencia a drogas, los cuales incluyen: la heterogeneidad tumoral, las barreras físicas, el microambiente tumoral, la cinética de crecimiento entre otros. La heterogeneidad tumoral involucra cambios fenotípicos y genotípicos dentro un tumor dado desde mutaciones con una tasa de aparición relativamente lenta sobre genes asociados a la resistencia a drogas hasta eventos drásticos como la cromotripsis y la inestabilidad cromosómica ¹⁶¹. Estos eventos en muchas ocasiones son empujados por las presiones selectivas como cambios en el microambiente tumoral, las dinámicas del metabolismo intermedio y exposición a factores exógenos como FRAX-1036 y KN93. Estos fenómenos ocasionan la aparición de clonas celulares con mutaciones de resistencia, respuestas adaptativas de señalización, sobreexpresión de bombas de expulsión de drogas y cambios epigenéticos que

ocasionan una serie de fenotipos tumorales cada uno con mecanismos diferentes que le otorgan la sobrevivencia y que su vez es compartido por medio de comunicaciones paracrinas a través de microvesículas y exosomas ^{162,163}. Dentro de la arquitectura tumoral, existen gradientes de flujo sanguíneo, creando ambientes hipóxicos y ácidos que provocan una disminución en la biodisponibilidad de los fármacos, efecto íntimamente relacionado con el microambiente tumoral ¹⁶⁴. Este es definido como el espacio circundante al tumor, compuesto por células del sistema inmune, el estroma y los vasos sanguíneos que provocan la obstaculización de los fármacos, la generación de metabolitos inactivos, entre otros ¹⁶⁵. Aunque aún no terminamos de comprender los mecanismos de resistencia a drogas, la biodisponibilidad de fármacos y en este caso la farmacología de FRAX-1036 y KN-93, estos experimentos nos permiten abordar diferentes áreas de oportunidad que nos permitan desarrollar herramientas para comprender cuales son los factores clave en el tratamiento exitoso contra el cáncer de mama triple negativo.

Tomando en cuenta que tanto Pak1 como CaMKII participan en la remodelación del citoesqueleto y por lo tanto en la migración e invasión celular, especulamos que la inhibición combinada de Pak1 y CaMKII pudiera tener mejores efectos en inhibir la migración e invasión celular que la inhibición individual, por lo tanto no fue extraño observar que la inhibición combinada redujera significativamente la migración e invasión en la línea celular triple negativa MDA-MB-231 y en el cultivo primario triple negativo MBCDF-B4. Indicando que, Pak1 y CaMKII podrían estar implicados en promover la invasión y metástasis en cáncer de mama triple negativo. Actualmente existen muchas evidencias que comprueban el papel de Pak1 en la metástasis e invasión, por ejemplo, Pak1 fosforila a ILK (Integrin-linked kinase) en la T173 y S246 promoviendo su translocación al núcleo regulando la transcripción de genes que confieren características invasivas, estimula la transcripción de IL-6 la cual regula negativamente la vía de NOTCH, curiosamente la vía NOTCH inhibe la señalización por Pak1, generando un “loop” de estimulación. De hecho, en cáncer de mama ILK correlaciona positivamente con un aumento en la agresividad tumoral y mal pronóstico ^{166,167,168}. Adicionalmente, se ha reportado que Pak1 también participa en la metástasis tumoral a través de la fosforilación de LIMK en el residuo de T508,

lo que da como resultado la fosforilación de Cofilina en la S3, impidiendo su capacidad de despolimerizar los filamentos de actina. LIMK participa en la formación de invadopodios y degradación de la matriz extracelular a través de metaloproteasas las cuales a su vez son reguladas por la señalización de Pak1 ^{169,170,171}. Por otra parte, se ha observado que Pak1 fosforila a cortactina (un activador de la polimerización de la actina) en la S405 y S418 aumentando su asociación con N-WASP, promoviendo el recambio de invadopodios, a su vez cortactina es regulado por p27kip1, limitando el número y actividad de los invadopodios. El silenciamiento de p27kip1, promueve una mayor estabilidad de los invadopodios debido a una falta en la interacción con Pak1 y Cortactina, pero su capacidad invasiva se reduce en comparación con las células silvestres ¹⁷². También, se ha demostrado que Pak1 regula la activación de la señalización RhoA/ROCK, la cual es uno de los principales reguladores de la remodelación del citoesqueleto, al participar en la migración celular por controlar la cantidad de filamentos de actina y la contractilidad celular por antagoniza la señalización de la insulina, reduciendo el metabolismo anabólico, inhibe indirectamente a PTEN, disrumpe los contacto célula-célula etc. ^{173,174,175}.

En el caso de CaMKII, aún no se ha dilucidado por completo el mecanismo por el cual esta cinasa puede impulsar la migración e invasión tumoral, sin embargo, en otras estirpes celulares CaMKII es necesaria para la remodelación del tejido cardíaco el cual implica la proliferación y migración de células de músculo liso en respuesta a una lesión en la vasculatura sistémica ¹⁷⁶. En el desarrollo embrionario del cerebro CaMKII juega un papel importante sobre las neuronas piramidales, regulando la migración neuronal, por lo que el silenciamiento de CaMKII provoca una migración acelerada de neuronas nacientes, mientras que la sobreexpresión inhibe la migración, lo que demuestra que se requiere una regulación precisa de la actividad de CaMKII ¹⁷⁷. En espermatozoides la vía de señalización CaM/CaMKII regula la motilidad en los espermatozoides en mamíferos, a través de la señalización de AMPc/PKA ¹⁷⁸. En cáncer, específicamente en glioblastoma CaMKII regula la expresión superficial del canal de cloruro activado por calcio (ANO1) el cual está asociado a la migración e invasión ¹⁷⁹. En cáncer de mama Skelding y colaboradores (2016) identifico que la sobreexpresión de mutantes fosfomiméticos

de CaMKII (T287D) aumenta la invasión, la migración, el crecimiento independiente a anclaje, además que la inhibición farmacológica de CaMKII disminuye la migración y la invasión de la línea celular MDA-MB-231 resultados acorde a los encontrados en nuestra investigación ¹⁸⁰.

Tomando en cuenta que tanto Pak1 como CaMKII activan a la GTPasa RhoA promoviendo la polimerización de actina y el crecimiento de neuritas, pensamos que la inhibición farmacológica combinada reduciría significativamente la activación de RhoA, sin embargo, el mejor efecto lo observamos al inhibir a CaMKII, resultado similar cuando utilizamos la inhibición dual, probablemente porque exista una encrucijada de señalización entre Pak1 y CaMKII que controlan la migración e invasión tumoral a través de RhoA. Describiendo por primera vez un nuevo eje de señalización Pak1/CaMKII/RhoA en cáncer de mama triple negativo con significado médico.

En conjunto, todos estos resultados proporcionan evidencia de que existe un nuevo eje de señalización Pak1/CaMKII que controla procesos de migración e invasión celular a través de la GTPasa RhoA en cáncer de mama triple negativo, cuya inhibición farmacológica combinada utilizando FRAX-1036 y KN93 es una estrategia prometedora para pacientes con este tipo de cáncer de mama.

8. CONCLUSIONES

1. Pak1 fosforila directamente a CAMKII y forman un complejo proteico *in silico* y en un contexto celular de cáncer de mama en una nueva ruta de señalización.
2. Las cinasas Pak1 y CAMKII se encuentran sobreexpresadas a nivel de proteína en líneas celulares de cáncer de mama humano con predominio en la línea SKBR-3 (Her2+) y MDA-MB-231 (Triple negativo)
3. Se confirmó este hallazgo en biopsias de cáncer de mama humano, sin embargo, Pak1 se encuentra sobreexpresada en biopsias del subtipo molecular luminal A, luminal B y triple negativa
4. CaMKII se encuentra sobreexpresada en todos los subtipos moleculares.
5. Existe una correlación positiva entre la expresión de Pak1 y CAMKII en biopsias de cáncer de mama del subtipo molecular luminal A, luminal B y triple negativo.
6. Existe una asociación positiva entre el grado histológico del tumor y una sobreexpresión de PAK1 y CAMKII
7. Las líneas celulares de cáncer de mama presentan menor valor de IC₅₀ tanto en FRAX-1036 como en KN93 comparado con la línea no tumorigénica MCF-10A, siendo las líneas SK-BR3 (Her2+) y MDA-MB-231 (triple negativa) las que presentaron mejor efecto.
8. La combinación de los fármacos FRAX-1036 y KN93 tienen efecto sinérgico en la línea celular MDA-MB-231 (triple negativa)
9. La inhibición farmacológica combinada de Pak1 y CAMKII aumenta significativamente la tasa de apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama siendo la línea MDA-MB-231 la que tiene el mejor efecto además que

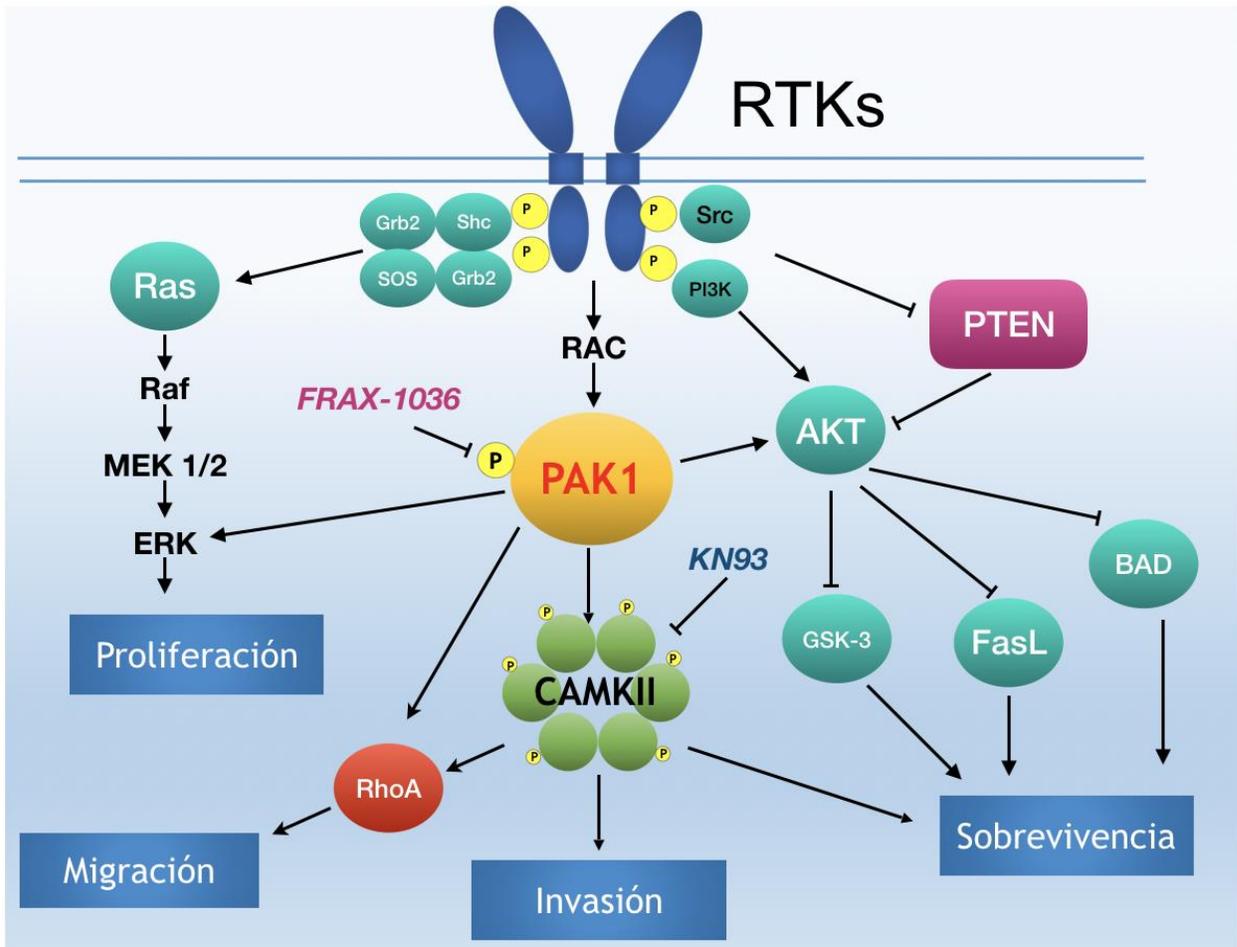
este combo farmacológico disminuye significativamente la capacidad migratoria e invasiva de la línea celular MDA-MB-231 (triple negativa) siendo confirmado en un cultivo primario triple negativo, pudiendo ser una estrategia terapéutica efectiva para el cáncer de mama triple negativo.

10. La sobreexpresión de Pak1 y CaMKII pueden considerarse biomarcadores de mal pronóstico en cáncer de mama.
11. Los ratones con los xenoinjertos de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 mostraron retraso en el crecimiento tumoral cuando se trataron con inhibidores farmacológicos de Pak o CaMKII, y el retraso de la inhibición combinada de ambos agentes fue significativa, además la combinación de FRAX-1036 y KN-93 tiene una actividad antiproliferativa y proapoptótica significativa contra las células de cáncer de mama triple negativo *in vivo*.

9. PERSPECTIVAS

- 1) Investigar el efecto biológico de la fosforilación de la T277 de CaMKII en cáncer de mama y en un entorno fisiológico.
- 2) Comprobar en un contexto celular el mecanismo de activación serial de CaMKII por Pak1.
- 3) Determinar el grado de fosforilación y por lo tanto de activación de Pak1 y CaMKII en biopsias de cáncer de mama humano.
- 4) Comprobar si existe una correlación entre los niveles de expresión a nivel de proteína de Pak1 y CaMKII tanto total como fosforilada con la supervivencia de pacientes con cáncer de mama.
- 5) Evaluar el nivel de activación de panel de proteínas asociadas a migración e invasión en cáncer de mama cuando se inhibe farmacológicamente Pak1 y CaMKII.
- 6) Determinar la farmacodinamia y farmacocinética de FRAX-1036 y KN93 en un modelo murino.
- 7) Evaluar el efecto de la combinación de FRAX-1036 y KN93 en un modelo murino xenotransplantado con líneas celulares del subtipo luminal A/B, HER2+ y cultivo primario del subtipo luminal A/B, HER2+ y triple negativo.

10. MODELO PROPUESTO PARA EL PAPEL DE PAK1/CAMKII EN LA MIGRACIÓN, INVASIÓN Y APOPTOSIS DE CELULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO.



11. LISTA DE ANTICUERPOS

Anticuerpo	Dilución	Compañía	Especie
Anti-Pak1	1:1,000	Cell signaling	Conejo
Anti-Pak1, fosforilado Pak1 (Ser199/204)	1:1,000	Cell signaling	Conejo
Anti-CaMKII, fosforilado-CaMKII (pT287)	1:1,000	Abcam	Conejo
Anti-CaMKII	1:1,000	Abcam	Conejo
Anti-myc	1:30,000	Cell signaling	Ratón
Anti-Tubulina	1:1,000	Cell signaling	Ratón
Anti-GAPDH	1:3,000	Cell signaling	Ratón
Anti-GFP	1:3,000	Santa Cruz	Ratón
Anti-conejo acoplado con HPR	1:10,000	Cell signaling	Cabra
Anti-ratón acoplado con HPR	1:10,000	Cell signaling	Cabra
anti-PCNA	1:1,000	Cell signaling	Ratón
anti-Caspasa 3 procesada	1:500	Cell signaling	Ratón
Anti-Actina	1:5,000	Cell signaling	Ratón

12. REFERENCIAS

-
- ¹ J. Ferlay et al., “Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods”, *International Journal of Cancer* 144, núm. 8 (el 15 de abril de 2019): 1941–53, <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
 - ² Hyuna Sung et al., “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, núm. 3 (mayo de 2021): 209–49, <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
 - ³ Rebecca L. Siegel et al., “Cancer Statistics, 2021”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, núm. 1 (enero de 2021): 7–33, <https://doi.org/10.3322/caac.21654>.
 - ⁴ Zhongyi Han et al., “Breast Cancer Multi-Classification from Histopathological Images with Structured Deep Learning Model”, *Scientific Reports* 7, núm. 1 (diciembre de 2017): 4172, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04075-z>.
 - ⁵ Fabio A. Spanhol et al., “A Dataset for Breast Cancer Histopathological Image Classification”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 63, núm. 7 (julio de 2016): 1455–62, <https://doi.org/10.1109/TBME.2015.2496264>.
 - ⁶ Charles M. Perou et al., “Molecular Portraits of Human Breast Tumours”, *Nature* 406, núm. 6797 (agosto de 2000): 747–52, <https://doi.org/10.1038/35021093>.
 - ⁷ T. Sorlie et al., “Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, núm. 19 (el 11 de septiembre de 2001): 10869–74, <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.
 - ⁸ Nadia Harbeck et al., “Breast Cancer”, *Nature Reviews Disease Primers* 5, núm. 1 (diciembre de 2019): 66, <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.
 - ⁹ Prem Chand et al., “Evaluation of Immunohistochemical Profile of Breast Cancer for Prognostics and Therapeutic Use”, *Nigerian Journal of Surgery* 24, núm. 2 (2018): 100, https://doi.org/10.4103/njs.NJS_2_18.
 - ¹⁰ Gonzalo Arturo Medina Bueno, “Características clínicas y pronósticas de los subtipos moleculares de cáncer de mama determinados por Inmunohistoquímica.

Arequipa, Perú”, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 34, núm. 3 (el 9 de octubre de 2017): 472, <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2530>.

¹¹ S. Guiu et al., “Molecular Subclasses of Breast Cancer: How Do We Define Them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement”, *Annals of Oncology* 23, núm. 12 (diciembre de 2012): 2997–3006, <https://doi.org/10.1093/annonc/mds586>.

¹² The Cancer Genome Atlas Network, “Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours”, *Nature* 490, núm. 7418 (octubre de 2012): 61–70, <https://doi.org/10.1038/nature11412>.

¹³ Zhi-hua Li et al., “Luminal B Breast Cancer: Patterns of Recurrence and Clinical Outcome”, *Oncotarget* 7, núm. 40 (el 4 de octubre de 2016): 65024–33, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11344>.

¹⁴ Aena Patel, Nisha Unni, y Yan Peng, “The Changing Paradigm for the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer”, *Cancers* 12, núm. 8 (el 28 de julio de 2020): 2081, <https://doi.org/10.3390/cancers12082081>.

¹⁵ Zahi Mitri, Tina Constantine, y Ruth O’Regan, “The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy”, *Chemotherapy Research and Practice* 2012 (el 20 de diciembre de 2012): 1–7, <https://doi.org/10.1155/2012/743193>.

¹⁶ Fn Aguiar et al., “Basal cytokeratin as a potential marker of low risk of invasion in ductal carcinoma in situ”, *Clinics* 68, núm. 5 (el 17 de mayo de 2013): 638–43, [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(05\)010](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(05)010).

¹⁷ Emad A. Rakha, Jorge S. Reis-Filho, y Ian O. Ellis, “Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review”, *Journal of Clinical Oncology* 26, núm. 15 (el 20 de mayo de 2008): 2568–81, <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1748>.

¹⁸ Anna M. Badowska-Kozakiewicz y Michał P. Budzik, “Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer”, *Współczesna Onkologia* 6 (2016): 436–43, <https://doi.org/10.5114/wo.2016.56938>.

¹⁹ Michiel Bolkestein et al., “Chromothripsis in Human Breast Cancer”, *Cancer Research* 80, núm. 22 (el 15 de noviembre de 2020): 4918–31, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1920>.

-
- ²⁰ Liliana Garcia-Martinez et al., “Epigenetic Mechanisms in Breast Cancer Therapy and Resistance”, *Nature Communications* 12, núm. 1 (diciembre de 2021): 1786, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22024-3>.
- ²¹ Angela Toss y Massimo Cristofanilli, “Molecular Characterization and Targeted Therapeutic Approaches in Breast Cancer”, *Breast Cancer Research* 17, núm. 1 (diciembre de 2015): 60, <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0560-9>.
- ²² Shantanu Banerji et al., “Sequence Analysis of Mutations and Translocations across Breast Cancer Subtypes”, *Nature* 486, núm. 7403 (el 21 de junio de 2012): 405–9, <https://doi.org/10.1038/nature11154>.
- ²³ Rena Callahan y Sara Hurvitz, “Human Epidermal Growth Factor Receptor-2-Positive Breast Cancer: Current Management of Early, Advanced, and Recurrent Disease”, *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 23, núm. 1 (febrero de 2011): 37–43, <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e3283414e87>.
- ²⁴ Y Yarden, “The EGFR Family and Its Ligands in Human Cancer”, *European Journal of Cancer* 37 (septiembre de 2001): 3–8, [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00230-1).
- ²⁵ Dima A. Sabbah, Rima Hajjo, y Kamal Sweidan, “Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors”, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 20, núm. 10 (el 19 de mayo de 2020): 815–34, <https://doi.org/10.2174/1568026620666200303123102>.
- ²⁶ Daniel M. Freed et al., “EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics”, *Cell* 171, núm. 3 (octubre de 2017): 683-695.e18, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.017>.
- ²⁷ Masami Nozaki, Hiroki Yasui, y Yuichi Ohnishi, “Ligand-Independent EGFR Activation by Anchorage-Stimulated Src Promotes Cancer Cell Proliferation and Cetuximab Resistance via ErbB3 Phosphorylation”, *Cancers* 11, núm. 10 (el 14 de octubre de 2019): 1552, <https://doi.org/10.3390/cancers11101552>.
- ²⁸ Sibylle Loibl y Luca Gianni, “HER2-Positive Breast Cancer”, *The Lancet* 389, núm. 10087 (junio de 2017): 2, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5).

-
- ²⁹ Chiara Arienti, Sara Pignatta, y Anna Tesei, “Epidermal Growth Factor Receptor Family and its Role in Gastric Cancer”, *Frontiers in Oncology* 9 (el 26 de noviembre de 2019): 1308, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01308>.
- ³⁰ Yixiao Feng et al., “Breast Cancer Development and Progression: Risk Factors, Cancer Stem Cells, Signaling Pathways, Genomics, and Molecular Pathogenesis”, *Genes & Diseases* 5, núm. 2 (junio de 2018): 77–106, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.
- ³¹ Hassan, “Chemotherapy for breast cancer (Review)”, *Oncology Reports* 24, núm. 5 (el 27 de septiembre de 2010), https://doi.org/10.3892/or_00000963.
- ³² Jan Haussmann et al., “Recent Advances in Radiotherapy of Breast Cancer”, *Radiation Oncology* 15, núm. 1 (diciembre de 2020): 71, <https://doi.org/10.1186/s13014-020-01501-x>.
- ³³ F. Lumachi et al., “Endocrine Therapy of Breast Cancer”, *Current Medicinal Chemistry* 18, núm. 4 (el 1 de febrero de 2011): 513–22, <https://doi.org/10.2174/092986711794480177>.
- ³⁴ Ramona F. Swaby, Catherine G. N. Sharma, y V. Craig Jordan, “SERMs for the Treatment and Prevention of Breast Cancer”, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 8, núm. 3 (el 2 de octubre de 2007): 229–39, <https://doi.org/10.1007/s11154-007-9034-4>.
- ³⁵ Maria da Conceição Barros-Oliveira et al., “Use of anastrozole in the chemoprevention and treatment of breast cancer: A literature review”, *Revista da Associação Médica Brasileira* 63, núm. 4 (abril de 2017): 371–78, <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.04.371>.
- ³⁶ Maira Huerta-Reyes et al., “Treatment of Breast Cancer With Gonadotropin-Releasing Hormone Analogs”, *Frontiers in Oncology* 9 (el 1 de octubre de 2019): 943, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00943>.
- ³⁷ Jiani Wang y Binghe Xu, “Targeted Therapeutic Options and Future Perspectives for HER2-Positive Breast Cancer”, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 4, núm. 1 (diciembre de 2019): 34, <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0069-2>.
- ³⁸ Kei Ishii, Nao Morii, y Hiroyasu Yamashiro, “Pertuzumab in the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer: An Evidence-Based Review of Its Safety, Efficacy,

and Place in Therapy”, *Core Evidence* Volume 14 (octubre de 2019): 51–70, <https://doi.org/10.2147/CE.S217848>.

³⁹ Adrienne G. Waks y Eric P. Winer, “Breast Cancer Treatment: A Review”, *JAMA* 321, núm. 3 (el 22 de enero de 2019): 288, <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.

⁴⁰ Harbeck et al., “Breast Cancer”.

⁴¹ Alistair Ring y Mitch Dowsett, “Mechanisms of tamoxifen resistance”, *Endocrine-Related Cancer* 11, núm. 4 (diciembre de 2004): 643–58, <https://doi.org/10.1677/erc.1.00776>.

⁴² Dan R Robinson et al., “Activating ESR1 Mutations in Hormone-Resistant Metastatic Breast Cancer”, *Nature Genetics* 45, núm. 12 (diciembre de 2013): 1446–51, <https://doi.org/10.1038/ng.2823>.

⁴³ M Clemons, S Danson, y A Howell, “Tamoxifen (‘Nolvadex’): A Review”, *Cancer Treatment Reviews* 28, núm. 4 (agosto de 2002): 165–80, [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(02\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(02)00036-1).

⁴⁴ Norbert Nass y Thomas Kalinski, “Tamoxifen Resistance: From Cell Culture Experiments towards Novel Biomarkers”, *Pathology - Research and Practice* 211, núm. 3 (marzo de 2015): 189–97, <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.01.004>.

⁴⁵ Keren Merenbakh-Lamin et al., “D538G Mutation in Estrogen Receptor- α : A Novel Mechanism for Acquired Endocrine Resistance in Breast Cancer”, *Cancer Research* 73, núm. 23 (el 1 de diciembre de 2013): 6856–64, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1197>.

⁴⁶ Peter Nagy et al., “Decreased Accessibility and Lack of Activation of ErbB2 in JIMT-1, a Herceptin-Resistant, MUC4-Expressing Breast Cancer Cell Line”, *Cancer Research* 65, núm. 2 (el 15 de enero de 2005): 473–82.

⁴⁷ Zsuzsanna Pályi-Krekk et al., “Hyaluronan-Induced Masking of ErbB2 and CD44-Enhanced Trastuzumab Internalisation in Trastuzumab Resistant Breast Cancer”, *European Journal of Cancer* 43, núm. 16 (noviembre de 2007): 2423–33, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.08.018>.

-
- ⁴⁸ Rita Nahta y Francisco J Esteva, “HER2 Therapy: Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance”, *Breast Cancer Research* 8, núm. 6 (diciembre de 2006): 215, <https://doi.org/10.1186/bcr1612>.
- ⁴⁹ Caroline Holm et al., “Association Between Pak1 Expression and Subcellular Localization and Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Patients”, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 98, núm. 10 (el 17 de mayo de 2006): 671–80, <https://doi.org/10.1093/jnci/djj185>.
- ⁵⁰ Edward Manser et al., “Molecular Cloning of a New Member of the P21-Cdc42/Rac-Activated Kinase (PAK) Family”, *Journal of Biological Chemistry* 270, núm. 42 (octubre de 1995): 25070–78, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.25070>.
- ⁵¹ Torsten Wittmann, Gary M. Bokoch, y Clare M. Waterman-Storer, “Regulation of Microtubule Destabilizing Activity of Op18/Stathmin Downstream of Rac1”, *Journal of Biological Chemistry* 279, núm. 7 (febrero de 2004): 6196–6203, <https://doi.org/10.1074/jbc.M307261200>.
- ⁵² Joan Roig y Jolinda A. Traugh, “P21-Activated Protein Kinase γ -PAK Is Activated by Ionizing Radiation and Other DNA-Damaging Agents”, *Journal of Biological Chemistry* 274, núm. 44 (octubre de 1999): 31119–22, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31119>.
- ⁵³ Yan Li et al., “Nucleo-Cytoplasmic Shuttling of PAK4 Modulates β -Catenin Intracellular Translocation and Signaling”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, núm. 2 (febrero de 2012), <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.013>.
- ⁵⁴ Rakesh Kumar et al., “Structure, Biochemistry, and Biology of PAK Kinases”, *Gene* 605 (marzo de 2017): 20–31, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.014>.
- ⁵⁵ Rajesh R. Singh et al., “Nuclear Localization and Chromatin Targets of P21-Activated Kinase 1”, *Journal of Biological Chemistry* 280, núm. 18 (mayo de 2005): 18130–37, <https://doi.org/10.1074/jbc.M412607200>.
- ⁵⁶ Yong Jae Shin et al., “Evidence for a Novel Mechanism of the PAK1 Interaction with the Rho-GTPases Cdc42 and Rac”, ed. Elad Katz, *PLoS ONE* 8, núm. 8 (el 1 de agosto de 2013): e71495, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071495>.

-
- ⁵⁷ G. M. Ku, “A PAK1-PIX-PKL complex is activated by the T-cell receptor independent of Nck, Slp-76 and LAT”, *The EMBO Journal* 20, núm. 3 (el 1 de febrero de 2001): 457–65, <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.457>.
- ⁵⁸ Wittmann, Bokoch, y Waterman-Storer, “Regulation of Microtubule Destabilizing Activity of Op18/Stathmin Downstream of Rac1”.
- ⁵⁹ Kaifan Zhang et al., “The P21-Activated Kinases in Neural Cytoskeletal Remodeling and Related Neurological Disorders”, *Protein & Cell*, el 11 de diciembre de 2020, <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00812-9>.
- ⁶⁰ Byung Hak Ha et al., “Signaling, Regulation, and Specificity of the Type II P21-Activated Kinases”, *Journal of Biological Chemistry* 290, núm. 21 (mayo de 2015): 12975–83, <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.650416>.
- ⁶¹ Yong Jae Shin, Yong-Bae Kim, y Jeong-Ho Kim, “Protein Kinase CK2 Phosphorylates and Activates P21-Activated Kinase 1”, ed. Benjamin Margolis, *Molecular Biology of the Cell* 24, núm. 18 (el 15 de septiembre de 2013): 2990–99, <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-04-0204>.
- ⁶² B. H. Ha et al., “Type II P21-Activated Kinases (PAKs) Are Regulated by an Autoinhibitory Pseudosubstrate”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, núm. 40 (el 2 de octubre de 2012): 16107–12, <https://doi.org/10.1073/pnas.1214447109>.
- ⁶³ Kazuhide Takahashi y Katsuo Suzuki, “Membrane Transport of WAVE2 and Lamellipodia Formation Require Pak1 That Mediates Phosphorylation and Recruitment of Stathmin/Op18 to Pak1–WAVE2–Kinesin Complex”, *Cellular Signalling* 21, núm. 5 (mayo de 2009): 695–703, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.007>.
- ⁶⁴ Maiko Higuchi et al., “Scaffolding Function of PAK in the PDK1–Akt Pathway”, *Nature Cell Biology* 10, núm. 11 (noviembre de 2008): 1356–64, <https://doi.org/10.1038/ncb1795>.
- ⁶⁵ Inseok Jang et al., “Pak1/LIMK1/Cofilin Pathway Contributes to Tumor Migration and Invasion in Human Non-Small Cell Lung Carcinomas and Cell Lines”, *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 16, núm. 3 (2012): 159, <https://doi.org/10.4196/kjpp.2012.16.3.159>.

-
- ⁶⁶ Jennifer J. Eby et al., “Actin Cytoskeleton Organization Regulated by the PAK Family of Protein Kinases”, *Current Biology* 8, núm. 17 (agosto de 1998): 967-S1, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)00398-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)00398-4).
- ⁶⁷ Peter Oladimeji y Maria Diakonova, “PAK1 Translocates into Nucleus in Response to Prolactin but Not to Estrogen”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 473, núm. 1 (abril de 2016): 206–11, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.079>.
- ⁶⁸ Abhijit Mazumdar y Rakesh Kumar, “Estrogen Regulation of Pak1 and FKHR Pathways in Breast Cancer Cells”, *FEBS Letters* 535, núm. 1–3 (el 30 de enero de 2003): 6–10, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03846-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03846-2).
- ⁶⁹ Eloy Andrés Pérez-Yépez et al., “P21 Activated Kinase 1: Nuclear Activity and Its Role during DNA Damage Repair”, *DNA Repair* 65 (mayo de 2018): 42–46, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.03.004>.
- ⁷⁰ R.-A. Wang, “P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium”, *The EMBO Journal* 21, núm. 20 (el 15 de octubre de 2002): 5437–47, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf543>.
- ⁷¹ B. Kang et al., “Phosphorylation of H4 Ser 47 Promotes HIRA-Mediated Nucleosome Assembly”, *Genes & Development* 25, núm. 13 (el 1 de julio de 2011): 47, <https://doi.org/10.1101/gad.2055511>.
- ⁷² Suresh B. Pakala et al., “Signaling-Dependent Phosphorylation of Mitotic Centromere-Associated Kinesin Regulates Microtubule Depolymerization and Its Centrosomal Localization”, *Journal of Biological Chemistry* 287, núm. 48 (noviembre de 2012): 40560–69, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399576>.
- ⁷³ Yan Qian et al., “PAK1 Silencing Is Synthetic Lethal with CDK4/6 Inhibition in Gastric Cancer Cells via Regulating PDK1 Expression”, *Human Cell* 33, núm. 2 (abril de 2020): 4, <https://doi.org/10.1007/s13577-019-00317-6>.
- ⁷⁴ Ratna K. Vadlamudi et al., “P21-Activated Kinase 1 Regulates Microtubule Dynamics by Phosphorylating Tubulin Cofactor B”, *Molecular and Cellular Biology* 25, núm. 9 (mayo de 2005): 3726–36, <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3726-3736.2005>.

-
- ⁷⁵ Feng Li et al., “P21-activated Kinase 1 Interacts with and Phosphorylates Histone H3 in Breast Cancer Cells”, *EMBO Reports* 3, núm. 8 (agosto de 2002): 3, <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf157>.
- ⁷⁶ Roig y Traugh, “P21-Activated Protein Kinase γ -PAK Is Activated by Ionizing Radiation and Other DNA-Damaging Agents”.
- ⁷⁷ Guiling Wang et al., “PAK1-Mediated MORC2 Phosphorylation Promotes Gastric Tumorigenesis”, *Oncotarget* 6, núm. 12 (el 30 de abril de 2015): 2, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3185>.
- ⁷⁸ Dahong Yao et al., “P21-Activated Kinase 1: Emerging Biological Functions and Potential Therapeutic Targets in Cancer”, *Theranostics* 10, núm. 21 (2020): 9741–66, <https://doi.org/10.7150/thno.46913>.
- ⁷⁹ Olga Villamar Cruz et al., “Reduced PAK1 Activity Sensitizes FA/BRCA-Proficient Breast Cancer Cells to PARP Inhibition”, *Oncotarget* 7, núm. 47 (el 22 de noviembre de 2016): 76590–603, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12576>.
- ⁸⁰ Diana Zi Ye y Jeffrey Field, “PAK Signaling in Cancer”, *Cellular Logistics* 2, núm. 2 (abril de 2012): 105–16, <https://doi.org/10.4161/cl.21882>.
- ⁸¹ Y Shrestha et al., “PAK1 Is a Breast Cancer Oncogene That Coordinately Activates MAPK and MET Signaling”, *Oncogene* 31, núm. 29 (julio de 2012): 3397–3408, <https://doi.org/10.1038/onc.2011.515>.
- ⁸² Sirigiri Divijendra Natha Reddy et al., “MicroRNA-7, a Homeobox D10 Target, Inhibits P21-Activated Kinase 1 and Regulates Its Functions”, *Cancer Research* 68, núm. 20 (el 15 de octubre de 2008): 8195–8200, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2103>.
- ⁸³ Villamar Cruz et al., “Reduced PAK1 Activity Sensitizes FA/BRCA-Proficient Breast Cancer Cells to PARP Inhibition”.
- ⁸⁴ L E Arias-Romero et al., “A Rac–Pak Signaling Pathway Is Essential for ErbB2-Mediated Transformation of Human Breast Epithelial Cancer Cells”, *Oncogene* 29, núm. 43 (octubre de 2010): 5839–49, <https://doi.org/10.1038/onc.2010.318>.
- ⁸⁵ Arthur S. Alberts et al., “PAK1 Negatively Regulates the Activity of the Rho Exchange Factor NET1”, *Journal of Biological Chemistry* 280, núm. 13 (abril de 2005): 1, <https://doi.org/10.1074/jbc.M405073200>.

-
- ⁸⁶ Diana Z. Ye et al., “P21-Activated Kinase 1 (Pak1) Phosphorylates BAD Directly at Serine 111 In Vitro and Indirectly through Raf-1 at Serine 112”, ed. Joseph Alan Bauer, *PLoS ONE* 6, núm. 11 (el 11 de noviembre de 2011): e27637, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027637>.
- ⁸⁷ Wang, “P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium”.
- ⁸⁸ Luis E. Arias-Romero et al., “Pak1 Kinase Links ErbB2 to β -Catenin in Transformation of Breast Epithelial Cells”, *Cancer Research* 73, núm. 12 (el 15 de junio de 2013): 3671–82, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4453>.
- ⁸⁹ Sayaka Takemoto-Kimura et al., “Calmodulin Kinases: Essential Regulators in Health and Disease”, *Journal of Neurochemistry* 141, núm. 6 (junio de 2017): 808–18, <https://doi.org/10.1111/jnc.14020>.
- ⁹⁰ Mark E. Anderson, Joan Heller Brown, y Donald M. Bers, “CaMKII in Myocardial Hypertrophy and Heart Failure”, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51, núm. 4 (octubre de 2011): 468–73, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.01.012>.
- ⁹¹ K. Ulrich Bayer y Howard Schulman, “CaM Kinase: Still Inspiring at 40”, *Neuron* 103, núm. 3 (agosto de 2019): 380–94, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.033>.
- ⁹² Peter Rellos et al., “Structure of the CaMKII δ /Calmodulin Complex Reveals the Molecular Mechanism of CaMKII Kinase Activation”, ed. Susan S. Taylor, *PLoS Biology* 8, núm. 7 (el 27 de julio de 2010): e1000426, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000426>.
- ⁹³ John E Lisman y Anatol M Zhabotinsky, “A Model of Synaptic Memory”, *Neuron* 31, núm. 2 (agosto de 2001): 191–201, [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00364-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00364-6).
- ⁹⁴ Yan-yang Wang, Ren Zhao, y Hong Zhe, “The Emerging Role of CaMKII in Cancer”, *Oncotarget* 6, núm. 14 (el 20 de mayo de 2015): 11725–34, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3955>.
- ⁹⁵ Maddalena Illario et al., “Calcium-Calmodulin-Dependent Kinase II (CaMKII) Mediates Insulin-Stimulated Proliferation and Glucose Uptake”, *Cellular Signalling* 21, núm. 5 (mayo de 2009): 786–92, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.022>.

-
- ⁹⁶ Paul G. Daft et al., “Alpha-CaMKII Plays a Critical Role in Determining the Aggressive Behavior of Human Osteosarcoma”, *Molecular Cancer Research* 11, núm. 4 (abril de 2013): 349–59, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0572>.
- ⁹⁷ Kathryn A. Skelding, John A.P. Rostas, y Nicole M. Verrills, “Controlling the Cell Cycle: The Role of Calcium/Calmodulin-Stimulated Protein Kinases I and II”, *Cell Cycle* 10, núm. 4 (el 15 de febrero de 2011): 631–39, <https://doi.org/10.4161/cc.10.4.14798>.
- ⁹⁸ N. Li et al., “Siva1 Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis of Tumor Cells by Inhibiting Stathmin and Stabilizing Microtubules”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, núm. 31 (el 2 de agosto de 2011): 1, <https://doi.org/10.1073/pnas.1017372108>.
- ⁹⁹ Padmini Rangamani et al., “Paradoxical Signaling Regulates Structural Plasticity in Dendritic Spines”, *Biophysical Journal* 110, núm. 3 (febrero de 2016): 371a–72, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.2003>.
- ¹⁰⁰ Hillary J. Haws, Melissa A. McNeil, y Marc D. H. Hansen, “Control of Cell Mechanics by RhoA and Calcium Fluxes during Epithelial Scattering”, *Tissue Barriers* 4, núm. 3 (el 2 de julio de 2016): e1187326, <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1187326>.
- ¹⁰¹ Matthew R Hart et al., “Inactive ERBB Receptors Cooperate With Reactive Oxygen Species To Suppress Cancer Progression”, *Molecular Therapy* 21, núm. 11 (noviembre de 2013): 1996–2007, <https://doi.org/10.1038/mt.2013.196>.
- ¹⁰³ José Esparza-López et al., “Primary Breast Cancer Cell Culture Yields Intra-Tumor Heterogeneous Subpopulations Expressing Exclusive Patterns of Receptor Tyrosine Kinases”, *BMC Cancer* 16, núm. 1 (diciembre de 2016): 740, <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2769-0>.
- ¹⁰⁴ Mary Ann Sells et al., “Human P21-Activated Kinase (Pak1) Regulates Actin Organization in Mammalian Cells”, *Current Biology* 7, núm. 3 (marzo de 1997): 202–10, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(97\)70091-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(97)70091-5).

-
- ¹⁰⁵ Onur Dagliyan et al., “Engineering Pak1 Allosteric Switches”, *ACS Synthetic Biology* 6, núm. 7 (el 21 de julio de 2017): 1257–62, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00359>.
- ¹⁰⁶ Sandeep Singh et al., “PEPstrMOD: Structure Prediction of Peptides Containing Natural, Non-Natural and Modified Residues”, *Biology Direct* 10, núm. 1 (diciembre de 2015): 73, <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0103-4>.
- ¹⁰⁷ H. M. Berman, “The Protein Data Bank”, *Nucleic Acids Research* 28, núm. 1 (el 1 de enero de 2000): 235–42, <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- ¹⁰⁸ Rellos et al., “Structure of the CaMKII δ /Calmodulin Complex Reveals the Molecular Mechanism of CaMKII Kinase Activation”.
- ¹⁰⁹ Jue Wang, Jia-Wei Wu, y Zhi-Xin Wang, “Structural Insights into the Autoactivation Mechanism of P21-Activated Protein Kinase”, *Structure* 19, núm. 12 (diciembre de 2011): 1752–61, <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.10.013>.
- ¹¹⁰ Dima Kozakov et al., “The ClusPro Web Server for Protein–Protein Docking”, *Nature Protocols* 12, núm. 2 (febrero de 2017): 255–78, <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>.
- ¹¹¹ Bing Xia, Sandor Vajda, y Dima Kozakov, “Accounting for Pairwise Distance Restraints in FFT-Based Protein–Protein Docking”, *Bioinformatics* 32, núm. 21 (el 1 de noviembre de 2016): 3342–44, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw306>.
- ¹¹² Elmar Krieger y Gert Vriend, “YASARA View—Molecular Graphics for All Devices—from Smartphones to Workstations”, *Bioinformatics* 30, núm. 20 (el 15 de octubre de 2014): 2981–82, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>.
- ¹¹³ Alonso Vivar-Sierra et al., “In Silico Study of Polyunsaturated Fatty Acids as Potential SARS-CoV-2 Spike Protein Closed Conformation Stabilizers: Epidemiological and Computational Approaches”, *Molecules* 26, núm. 3 (el 29 de enero de 2021): 711, <https://doi.org/10.3390/molecules26030711>.
- ¹¹⁴ Ting-Chao Chou, “Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method”, *Cancer Research* 70, núm. 2 (el 15 de enero de 2010): 440–46, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>.
- ¹¹⁵ Begoña Díaz, “Invadopodia Detection and Gelatin Degradation Assay”, *BIO-PROTOCOL* 3, núm. 24 (2013), <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.997>.

-
- ¹¹⁶ Higuchi et al., “Scaffolding Function of PAK in the PDK1–Akt Pathway”.
- ¹¹⁷ Arias-Romero et al., “Pak1 Kinase Links ErbB2 to β -Catenin in Transformation of Breast Epithelial Cells”.
- ¹¹⁸ Holm et al., “Association Between Pak1 Expression and Subcellular Localization and Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Patients”.
- ¹¹⁹ Higuchi et al., “Scaffolding Function of PAK in the PDK1–Akt Pathway”.
- ¹²⁰ Dagliyan et al., “Engineering Pak1 Allosteric Switches”.
- ¹²¹ Ye y Field, “PAK Signaling in Cancer”.
- ¹²² Melanie H. Wong et al., “The KN-93 Molecule Inhibits Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Activity by Binding to Ca^{2+} /CaM”, *Journal of Molecular Biology* 431, núm. 7 (marzo de 2019): 93, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.001>.
- ¹²³ Chou, “Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method”.
- ¹²⁴ Shivaani Kummar et al., “Drug Development in Oncology: Classical Cytotoxics and Molecularly Targeted Agents”, *British Journal of Clinical Pharmacology* 62, núm. 1 (julio de 2006): 15–26, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02713.x>.
- ¹²⁵ T Y Prudnikova et al., “Effects of P21-Activated Kinase 1 Inhibition on 11q13-Amplified Ovarian Cancer Cells”, *Oncogene* 35, núm. 17 (el 28 de abril de 2016): 2178–85, <https://doi.org/10.1038/onc.2015.278>.
- ¹²⁶ Alexander Hoffman et al., “Dephosphorylation of CaMKII at T253 Controls the Metaphase–Anaphase Transition”, *Cellular Signalling* 26, núm. 4 (abril de 2014): 748–56, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.015>.
- ¹²⁷ Hyuna Sung et al., “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, núm. 3 (mayo de 2021): 209–49, <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- ¹²⁸ Charles M. Perou et al., “Molecular Portraits of Human Breast Tumours”, *Nature* 406, núm. 6797 (agosto de 2000): 747–52, <https://doi.org/10.1038/35021093>.

-
- ¹²⁹ Y Shrestha et al., “PAK1 Is a Breast Cancer Oncogene That Coordinately Activates MAPK and MET Signaling”, *Oncogene* 31, núm. 29 (julio de 2012): 3397–3408, <https://doi.org/10.1038/onc.2011.515>.
- ¹³⁰ Bettina Dummler y Jeffrey Field, “Amplifying Pak Kinases”, *Cancer Biology & Therapy* 7, núm. 11 (noviembre de 2008): 1803–5, <https://doi.org/10.4161/cbt.7.11.7192>.
- ¹³¹ Babette Schade et al., “ β -Catenin Signaling Is a Critical Event in ErbB2-Mediated Mammary Tumor Progression”, *Cancer Research* 73, núm. 14 (el 15 de julio de 2013): 4474–87, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3925>.
- ¹³² G Zhu et al., “A Rac1/PAK1 Cascade Controls β -Catenin Activation in Colon Cancer Cells”, *Oncogene* 31, núm. 8 (febrero de 2012): 1001–12, <https://doi.org/10.1038/onc.2011.294>.
- ¹³³ Wang, Zhao, y Zhe, “The Emerging Role of CaMKII in Cancer”.
- ¹³⁴ Stephen G. Miller, Bruce L. Patton, y Mary B. Kennedy, “Sequences of Autophosphorylation Sites in Neuronal Type II CaM Kinase That Control Ca²⁺-Independent Activity”, *Neuron* 1, núm. 7 (septiembre de 1988): 593–604, [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90109-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90109-2).
- ¹³⁵ Rellos et al., “Structure of the CaMKII δ /Calmodulin Complex Reveals the Molecular Mechanism of CaMKII Kinase Activation”.
- ¹³⁶ Higuchi et al., “Scaffolding Function of PAK in the PDK1–Akt Pathway”.
- ¹³⁷ Christy C Ong 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 Research* 17, núm. 1 (diciembre de 2015): 59, <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0564-5>.
- ¹³⁸ Hoi Yee Chow et al., “P21-Activated Kinase 1 Is Required for Efficient Tumor Formation and Progression in a Ras-Mediated Skin Cancer Model”, *Cancer Research* 72, núm. 22 (el 15 de noviembre de 2012): 5966–75, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2246>.
- ¹³⁹ Prudnikova et al., “Effects of P21-Activated Kinase 1 Inhibition on 11q13-Amplified Ovarian Cancer Cells”.

-
- ¹⁴⁰ Alexey Goltsov et al., “Compensatory Effects in the PI3K/PTEN/AKT Signaling Network Following Receptor Tyrosine Kinase Inhibition”, *Cellular Signalling* 23, núm. 2 (febrero de 2011): 407–16, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.011>.
- ¹⁴¹ Shrestha et al., “PAK1 Is a Breast Cancer Oncogene That Coordinately Activates MAPK and MET Signaling”, julio de 2012.
- ¹⁴² Johannes Backs et al., “Histone Deacetylase 5 Acquires Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Responsiveness by Oligomerization with Histone Deacetylase 4”, *Molecular and Cellular Biology* 28, núm. 10 (el 15 de mayo de 2008): 3437–45, <https://doi.org/10.1128/MCB.01611-07>.
- ¹⁴³ Allison P Belsches-Jablonski et al., “Src Family Kinases and HER2 Interactions in Human Breast Cancer Cell Growth and Survival”, *Oncogene* 20, núm. 12 (marzo de 2001): 1465–75, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204205>.
- ¹⁴⁴ Ana Ruiz-Saenz et al., “HER2 Amplification in Tumors Activates PI3K/Akt Signaling Independent of HER3”, *Cancer Research*, el 14 de mayo de 2018, canres.0430.2018, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0430>.
- ¹⁴⁵ Anna M. Valentini et al., “RAS-Expanded Mutations and HER2 Expression in Metastatic Colorectal Cancer: A New Step of Precision Medicine”, *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 26, núm. 8 (septiembre de 2018): 539–44, <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000475>.
- ¹⁴⁶ Alessandra Magnifico et al., “Protein Kinase C α Determines HER2 Fate in Breast Carcinoma Cells with HER2 Protein Overexpression without Gene Amplification”, *Cancer Research* 67, núm. 11 (el 1 de junio de 2007): 5308–17, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3936>.
- ¹⁴⁷ Pavel Sidorov et al., “Predicting Synergism of Cancer Drug Combinations Using NCI-ALMANAC Data”, *Frontiers in Chemistry* 7 (el 16 de julio de 2019): 509, <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00509>.
- ¹⁴⁸ Vladislav Korobeynikov et al., “Combined Inhibition of Aurora A and P21-Activated Kinase 1 as a New Treatment Strategy in Breast Cancer”, *Breast Cancer Research and Treatment* 177, núm. 2 (septiembre de 2019): 369–82, <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05329-2>.

-
- ¹⁴⁹ Guo-Lei Zhou et al., “Akt Phosphorylation of Serine 21 on Pak1 Modulates Nck Binding and Cell Migration”, *Molecular and Cellular Biology* 23, núm. 22 (el 15 de noviembre de 2003): 8058–69, <https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.8058-8069.2003>.
- ¹⁵⁰ Ye Yuanxin et al., “Pak1 Gene Functioned Differentially in Different BCR-ABL Subtypes in Leukemiagenesis and Treatment Response through STAT5 Pathway”, *Leukemia Research* 79 (abril de 2019): 6–16, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.01.012>.
- ¹⁵¹ Arias-Romero et al., “Pak1 Kinase Links ErbB2 to β -Catenin in Transformation of Breast Epithelial Cells”.
- ¹⁵² Shrestha et al., “PAK1 Is a Breast Cancer Oncogene That Coordinately Activates MAPK and MET Signaling”, julio de 2012.
- ¹⁵³ Weiwei Shi et al., “SphK2/S1P Promotes Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer Through the PAK1/LIMK1/Cofilin1 Signaling Pathway”, *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (el 22 de abril de 2021): 598218, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.598218>.
- ¹⁵⁴ Wided Najahi-Missaoui et al., “Liposomes Targeting P21 Activated Kinase-1 (PAK-1) and Selective for Secretory Phospholipase A2 (SPLA2) Decrease Cell Viability and Induce Apoptosis in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Cells”, *International Journal of Molecular Sciences* 21, núm. 24 (el 10 de diciembre de 2020): 9396, <https://doi.org/10.3390/ijms21249396>.
- ¹⁵⁵ Kaiyu Yuan et al., “ α -CaMKII Controls the Growth of Human Osteosarcoma by Regulating Cell Cycle Progression”, *Laboratory Investigation* 87, núm. 9 (septiembre de 2007): 938–50, <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700658>.
- ¹⁵⁶ Xiaomeng Dai et al., “Targeting CAMKII to Reprogram Tumor-Associated Macrophages and Inhibit Tumor Cells for Cancer Immunotherapy with an Injectable Hybrid Peptide Hydrogel”, *Theranostics* 10, núm. 7 (2020): 3049–63, <https://doi.org/10.7150/thno.42385>.
- ¹⁵⁷ Korobeynikov et al., “Combined Inhibition of Aurora A and P21-Activated Kinase 1 as a New Treatment Strategy in Breast Cancer”.
- ¹⁵⁸ Tatiana Y. Prudnikova y Jonathan Chernoff, “The Group I Pak Inhibitor Frax-1036 Sensitizes 11q13-Amplified Ovarian Cancer Cells to the Cytotoxic Effects of

Rottlerin”, *Small GTPases* 8, núm. 4 (el 2 de octubre de 2017): 193–98, <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1213089>.

¹⁵⁹ Prudnikova et al., “Effects of P21-Activated Kinase 1 Inhibition on 11q13-Amplified Ovarian Cancer Cells”.

¹⁶⁰ Hoi-Yee Chow et al., “Group I Paks as Therapeutic Targets in *NF2* -Deficient Meningioma”, *Oncotarget* 6, núm. 4 (el 10 de febrero de 2015): 1981–94, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2810>.

¹⁶¹ Bolkestein et al., “Chromothripsis in Human Breast Cancer”.

¹⁶² Neil Vasan, José Baselga, y David M. Hyman, “A View on Drug Resistance in Cancer”, *Nature* 575, núm. 7782 (el 14 de noviembre de 2019): 299–309, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>.

¹⁶³ Mel Greaves, “Evolutionary Determinants of Cancer”, *Cancer Discovery* 5, núm. 8 (agosto de 2015): 806–20, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0439>.

¹⁶⁴ R. K. Jain, “Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy”, *Science* 307, núm. 5706 (el 7 de enero de 2005): 58–62, <https://doi.org/10.1126/science.1104819>.

¹⁶⁵ Andrew I. Minchinton y Ian F. Tannock, “Drug Penetration in Solid Tumours”, *Nature Reviews Cancer* 6, núm. 8 (agosto de 2006): 583–92, <https://doi.org/10.1038/nrc1893>.

¹⁶⁶ Hong He y Hiroshi Maruta, “Oncogenicity of PAKs and Their Substrates”, en *Paks, Rac/Cdc42 (P21)-Activated Kinases* (Elsevier, 2013), 23–51, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407198-8.00002-3>.

¹⁶⁷ Ji-Hye Yoon et al., “NOTCH1 Intracellular Domain Negatively Regulates PAK1 Signaling Pathway through Direct Interaction”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, núm. 2 (febrero de 2016): 179–88, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.001>.

¹⁶⁸ F. Acconcia et al., “Phosphorylation-Dependent Regulation of Nuclear Localization and Functions of Integrin-Linked Kinase”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, núm. 16 (el 17 de abril de 2007): 6782–87, <https://doi.org/10.1073/pnas.0701999104>.

-
- ¹⁶⁹ Jang et al., “Pak1/LIMK1/Cofilin Pathway Contributes to Tumor Migration and Invasion in Human Non-Small Cell Lung Carcinomas and Cell Lines”.
- ¹⁷⁰ David C. Edwards et al., “Activation of LIM-Kinase by Pak1 Couples Rac/Cdc42 GTPase Signalling to Actin Cytoskeletal Dynamics”, *Nature Cell Biology* 1, núm. 5 (septiembre de 1999): 253–59, <https://doi.org/10.1038/12963>.
- ¹⁷¹ Violaine Delorme et al., “Cofilin Activity Downstream of Pak1 Regulates Cell Protrusion Efficiency by Organizing Lamellipodium and Lamella Actin Networks”, *Developmental Cell* 13, núm. 5 (noviembre de 2007): 646–62, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.08.011>.
- ¹⁷² Alexandre Grassart et al., “Pak1 Phosphorylation Enhances Cortactin-N-WASP Interaction in Clathrin-Caveolin-Independent Endocytosis”, *Traffic* 11, núm. 8 (agosto de 2010): 1079–91, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01075.x>.
- ¹⁷³ Kirsi Riento y Anne J. Ridley, “ROCKs: Multifunctional Kinases in Cell Behaviour”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, núm. 6 (junio de 2003): 446–56, <https://doi.org/10.1038/nrm1128>.
- ¹⁷⁴ Zhong Li et al., “Regulation of PTEN by Rho Small GTPases”, *Nature Cell Biology* 7, núm. 4 (el 1 de abril de 2005): 399–404, <https://doi.org/10.1038/ncb1236>.
- ¹⁷⁵ T Leung et al., “The P160 RhoA-Binding Kinase ROK Alpha Is a Member of a Kinase Family and Is Involved in the Reorganization of the Cytoskeleton”, *Molecular and Cellular Biology* 16, núm. 10 (octubre de 1996): 5313–27, <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5313>.
- ¹⁷⁶ John Huetsch, Haiyang Jiang, y Larissa Shimoda, “CaMKII Is Necessary for Proliferation and Migration of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells”, *The FASEB Journal* 34, núm. S1 (abril de 2020): 1–1, <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.03105>.
- ¹⁷⁷ Olivier Nicole et al., “A Novel Role for CAMKII β in the Regulation of Cortical Neuron Migration: Implications for Neurodevelopmental Disorders”, *Molecular Psychiatry* 23, núm. 11 (noviembre de 2018): 2209–26, <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0046-0>.
- ¹⁷⁸ K. Schlingmann et al., “Calmodulin and CaMKII in the Sperm Principal Piece: Evidence for a Motility-Related Calcium/Calmodulin Pathway”, *Journal of Andrology*

28, núm. 5 (el 23 de mayo de 2007): 706–16, <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.001669>.

¹⁷⁹ Kyoung Mi Sim et al., “Suppression of CaMKII β Inhibits ANO1-Mediated Glioblastoma Progression”, *Cells* 9, núm. 5 (el 26 de abril de 2020): 1079, <https://doi.org/10.3390/cells9051079>.

¹⁸⁰ Mengna Chi et al., “Phosphorylation of Calcium/Calmodulin-Stimulated Protein Kinase II at T286 Enhances Invasion and Migration of Human Breast Cancer Cells”, *Scientific Reports* 6, núm. 1 (diciembre de 2016): 33132, <https://doi.org/10.1038/srep33132>.