

UCH-FC  
Biotecnología  
T628  
E-1



*FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE*

**RAC1 MODULA LAS PROPIEDADES INVASIVAS  
DE CÉLULAS MAMARIAS HUMANAS**

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

**Nicolás Andrés Tobar Bachler**

Marzo de 2008  
Santiago- Chile

Director de Tesis: Dr. Jorge Martinez Winkler

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“RAC1 MODULA LAS PROPIEDADES INVASIVAS  
DE CÉLULAS MAMARIAS HUMANAS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**NICOLÁS ANDRÉS TOBAR BACHLER**

*Dr. Jorge Martínez Winkler*  
**Director Seminario de Título**

Firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

*Dr. Marco Tulio Nuñez González*  
**Presidente Comisión**

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

*Dr. Alejandro Roth Metcalfe*  
**Corrector**

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, marzo de 2008

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de tesis, a quienes han sido el soporte durante estos largos años de universidad. A todos aquellos que con su presencia se transformaron en fuerzas para seguir siempre adelante, sin importar las adversidades.

En especial deseo regalar las numerosas jornadas de trabajo y estudio, a mis padres Juan y Marta, a mis hermanos, Sebastián y Cristóbal y a mi novia Sussy. Pues sin ellos, este recorrido no solo hubiese sido largo, sino imposible.

Dedico esta tesis, a los que día tras día en el laboratorio, han sido los guías para que este trabajo tenga un sentido lógico y pueda estar hoy, graduándome como Biotecnólogo. Muy especialmente: a mi tutor Jorge Martínez, a mi jefa Mónica Cáceres, a Juan Fco., a mis partner; Javier, Pablo y Ro, y a los profesores y compañeros de laboratorio.

Finalmente y no por eso menos importantes, también quiero dedicar mi tesis, a la Tita, al Tata Rimba y a mis tíos Oscar, Lucy, Tere y Cito, pues con su amor y preocupación, hoy creo ser una mejor persona.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a quienes han hecho posible la realización de esta tesis, especialmente a: Jorge Martínez, Mónica Cáceres, Javier Guerrero, Juan fco. Santibáñez, Patricio Smith, Pablo Astudillo, Rodrigo Arancibia, José Adasme, Felicita Rodríguez, Laboratorio de Biología Celular, Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, Laboratorio de Biotecnología, Laboratorio de Hormonas y Receptores

Adicionalmente, quiero agradecer al profesor Juan Francisco Santibáñez, por ser quien me facilitara los plásmidos para ver la actividad de NF $\kappa$ B y el promotor de uPA.



Nicolás Andrés Tobar Bachler, nació el 17 de mayo de 1978 y con sus cercanos 30 años ha desarrollado una amplia carrera universitaria. A finales de los 90' cursó el programa de Bachillerato, iniciando así su formación científica muy ligado al mundo de las ciencias sociales, gracias a su participación en cuanto evento extra curricular surgiera. Participó del Centro de estudiantes de Bachillerato CEBA, luego asumió el quiosco de la Facultad de Ciencias. Una vez siendo alumno de biotecnología asumió como vice-presidente del centro de estudiantes de ciencias CEC y participó tanto del comité de difusión de la Biotecnología como de la formación del Colegio de Biotecnólogos de Chile A.G.

Por estos días trabaja en el Laboratorio de Biología Celular del INTA, perteneciente a la Universidad de Chile, en donde desde 2002, ha desarrollado varios trabajos de investigación incluida esta tesis. Paralelamente trabaja en el ámbito de las patentes de invención para un estudio de abogados y participa de cuanta pichanga, maratón y asado sea programado.

Claramente SOY una persona con múltiples inquietudes algunas de las cuales están plasmadas en este trabajo de tesis.

# INDICE DE MATERIAS

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	1
1.1. Transición Epitelio-Mesenquima.	1
1.2. GTPasas de la familia Rho.	3
1.3. Estado Redox y Cáncer.	5
1.4. Las GTPasas de la familia Rho en la generación de ROS.	7
1.5. La vía de NF $\kappa$ B.	8
<b>2. HIPÓTESIS.</b>	11
<b>3. OBJETIVOS.</b>	12
3.1. General.	12
3.2. Específicos.	12
<b>4. MATERIALES.</b>	13
4.1. Instrumentos y equipos.	13
4.2. Reactivos.	13
4.3. Anticuerpos generales.	14
<b>5. MÉTODOS.</b>	15
5.1. Cultivo celular.	15
5.2. Crio-preservación de las células.	15
5.3. Método de transfección.	16
5.4. Separación de la GTPasa activa por ensayo de pull-down.	17
5.5. Western Blot.	19

5.6. Inmunofluorescencia.	19
5.7. Ensayo de invasión.	20
5.8. Ensayo de agregación.	21
5.9. Determinación de ROS.	22
5.10. Ensayos de actividad, utilizando un gen reportero.	23
5.11. RT-PCR.	25
5.12. Test Estadístico	27
<b>6. RESULTADOS.</b>	<b>28</b>
I. Generación de clones estables que sobre-expresan una versión dominante negativa de Rac1 (RacN17).	28
II. Caracterización fenotípico-funcional de los clones estables con la versión dominante negativa de Rac1 (RacN17).	30
a. Expresión y localización de Cadherina-E.	28
b. Funcionalidad de Cadherina-E	32
c. Evaluación de la capacidad migratoria.	33
d. Determinación de la expresión de Uroquinasa (uPA).	35
III. Efecto de la actividad de Rac1 sobre propiedades del fenotipo invasivo.	37
a. Evaluación de la capacidad invasiva.	37
b. Medición de la actividad del promotor de Uroquinasa (uPA).	39
c. Determinación de la producción de especies reactivas derivadas de oxígeno (ROS), en células con distintos niveles de actividad de Rac.	40

IV.	Correlación entre los niveles de ROS y la capacidad migratoria.	42
a.	Efecto de antioxidantes en la migración celular.	42
b.	Efecto de un agente oxidante en la migración celular.	45
c.	Evaluación de la participación de NOX en la generación de ROS.	46
V.	Evaluación del papel de NOX en la invasividad dependiente de Rac1.	48
VI.	Evaluación de la participación de NFκB en la señalización de Rac1.	49
a.	Efecto de los ROS en la activación de la vía de NFκB.	49
b.	La actividad de Rac es capaz de modular la vía de NFκB.	50
c.	Evaluación de la expresión de uPA, dependiente de NFκB.	51
d.	Evaluación de la capacidad invasiva, dependiente de NFκB.	53
7.	DISCUSIÓN.	54
8.	CONCLUSIONES.	61
9.	BLOGRAFIA.	63

## INDICE DE TABLAS Y EQUEMAS

1. Esquema # 1 Ciclo de actividad de las GTPasas de la familia Rho.	4
2. Esquema # 2 Plasmido utilizado en las transfecciones.	16
3. Esquema # 3 Sistema de doble cámara (transwell).	21
4. Esquema # 4 Reacción de conversión de la DCHF-DA.	22
5. Tabla #1 Partidores utilizados en RT-PCR.	27

## ÍNDICE DE FIGURAS.

1. a. Microfotografía de los clones seleccionados.  
b. Pulldown para Rac, en clones seleccionados.
2. a. Inmuno fluorescencia para Cadherina-E, en clones seleccionados.  
b. RT-PCR para Cadherina-E, Snail, MMP-1 y GPDH, en clones seleccionados.
3. Ensayo de Agregación, en clones seleccionados.
4. Ensayo de Invasión, en clones seleccionados.
5. RT-PCR para uroquinasa (uPA), en clones seleccionados.
6. Ensayo de invasión, en células transfectadas con distintas formas de Rac.
7. Actividad del promotor de uPA, en células transfectadas con distintas formas de Rac.
8. Determinación de ROS, en células transfectadas con distintas formas de Rac.
9. a. Determinación de ROS, en células transfectadas con Msr-A.  
b. Westerblot para Msr-A, en células transfectadas con Msr-A.
10. Ensayo de invasión para agentes reductores.
11. Ensayo de invasión para agente oxidante.
12. Determinación de ROS, en células tratadas con DPI.
13. Ensayo de invasión en células tratadas con DPI.
14. Actividad de la vía de NF $\kappa$ B en función del estado redox.
15. Actividad de la vía de NF $\kappa$ B, en células transfectadas con distintas formas de Rac.
16. RT-PCR para uPA, en células transfectadas con pI $\kappa$ B $\alpha$ .
17. Ensayo de invasión, en células transfectadas con pI $\kappa$ B $\alpha$ .

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	albúmina de suero bovino
CaCl <sub>2</sub>	cloruro de calcio
CDK	quinasa dependiente de ciclina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de cobre
DCF	Diclorofluoresceína
DCHFDA	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfoxido
DOC	ácido deoxicólico
DPI	diphenyleneiodonium chloride
DTT	1,4 ditio -DL- treitol
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGFR	receptor de factor de crecimiento epidérmico
HCl	ácido clorhídrico
IPTG	isopropil-tio-galactosidasa
KCl	cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub>	fosfato diácido de potasio
LPA	ácido lisofosfatídico
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
MMP	metaloproteasa de matriz
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
Msr-A	metionin sulfoxido reductase
MTT	1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
NAC	n-acetil cisteína
NaCl	cloruro de sodio

NaF	fluoruro de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato diácido de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
TBE	tampón tis borato EDTA
TBS	tampón tris salino
TEM	transición epitelio-mesénquima
uPA	activador del plasminógeno del tipo Uroquinasa

## RESUMEN

Las pequeñas GTPasas de la familia Rho están involucradas en una serie de procesos celulares tales como la reorganización del citoesqueleto de actina, la adhesión célula-célula, la migración celular y la defensa contra patógenos, a través de la fagocitosis y la actividad NADPH oxidasa

En este trabajo hemos utilizado una línea tumoral de origen mamario (MCF-7), para investigar el efecto de la actividad de Rac1 sobre propiedades que modulan la motilidad celular. Observamos, que la disminución de la actividad de Rac, mediante la sobre-expresión de una versión dominante negativa de Rac1 (RacN17), es capaz de disminuir la expresión de Caderina E, y aumentar la expresión de snail, represor transcripcional del promotor de Caderina E.

Por otra parte; utilizando la versión dominante negativa y la permanentemente activa (RacV12) de Rac1, establecimos que su actividad está asociada con la producción de ROS intracelulares, los cuales modulan la migración celular proceso que, involucra un aumento en la expresión de Uroquinasa dependiente de la activación de NF $\kappa$ B.

Adicionalmente, nuestros resultados evidencian una posible participación de la NADPH oxidasa como fuente generadora de los ROS en respuesta a la actividad de Rac1. Esto sugiere que Rac1 juega un rol en la migración celular, no solo limitado a su conocida función en la reorganización del citoesqueleto, sino también como parte de la maquinaria intracelular encargada de controlar el balance redox.

## ABSTRACT

Rho GTPases are involved in a variety of cellular processes such as organization of the actin cytoskeleton, cell – cell contact, cell migration and microbial killing through phagocytosis and NADPH oxidase activity.

In the present study we demonstrated that changes in Rac1 activity associated with the production of intracellular ROS modulate the migratory properties in a human mammary cell line MCF-7. Our results show that down-regulation of Rac1 activity enhanced the expression of Snail and, consequently, diminished E-cadherin expression in dominant negative Rac1 clones. Additionally, using both the dominant negative (RacN17) and permanently active form (RacV12) of Rac1, we established that the activity of this GTPase modulates cell invasion, in a process that combines the modification of the intracellular Redox state, the consequent activation of Nuclear Factor kappa B (NF $\kappa$ B) and Urokinase (uPA) production.

These results emphasize the importance of redox balance in the acquisition of malignancy and support previous data sustaining that an oxidative environment predisposes cells to activate signal-transduction pathways actively involved in cellular oncogenesis.

Our data also provides evidence that NADPH oxidase could constitute the main source of intracellular ROS in response to changes in Rac1 activity. We suggest that Rac1 plays a role in cellular migration not only limited to its known function in reorganization of the actin cytoskeleton; but also as part of the intracellular machinery that controls the redox balance.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Un porcentaje mayoritario de los cánceres humanos corresponden a carcinomas, es decir, derivan de células epiteliales (Hanahan y Weinberg 2000). En los estados avanzados de la enfermedad, las células que provienen de un carcinoma *in situ* pierden muchas de sus propiedades epiteliales (Woodhouse, Chuaqui y Col. 1997). Entre los rasgos característicos de este cambio fenotípico podemos identificar: la pérdida de adhesión y posición restringida dentro de un tejido organizado; la pérdida de polaridad y la adquisición de la capacidad de migrar e invadir territorios distantes, fenómeno conocido como metástasis (Thiery y Chopin 1999).

Las seis alteraciones más comunes en el cáncer humano son: la capacidad de la célula de adquirir independencia de señales de crecimiento, presentar insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evadir la muerte celular programada, poseer potencial replicativo ilimitado, producir angiogenesis sostenida e invadir nuevos tejidos formando metástasis (Hanahan y Weinberg 2000). Estas dos últimas alteraciones son características comunes a los tumores más agresivos y mortales siendo los pasos limitantes la pérdida de adhesión célula-célula, la adquisición de propiedades móviles y la autonomía de crecimiento. Estos procesos se asocian a una transformación morfológica designada a menudo como transición epitelio-mesénquima (TEM).

### 1.1. Transición Epitelio-Mesénquima.

La TEM es un fenómeno que se produce de manera controlada desde etapas tempranas del desarrollo y que se asocia a la reorganización de tejidos y órganos en varios de los procesos morfogenéticos (Hay y Zuk 1995; Boyer, Valles y Col. 2000; Savagner 2001). Sin embargo, en células cancerosas, la TEM refleja una falla en los mecanismos que median el reconocimiento célula-célula y una falla en el

mantenimiento de la forma y polaridad de las células (Thiery 2002). Este fenómeno, relacionado con la modulación de propiedades funcionales que permiten que la célula invasiva se movilice y sobreviva en un ambiente distinto al que le dio origen, va asociado con la reestructuración del citoesqueleto que permite la movilización, reorganización de complejos de adhesión y cambio en el patrón de expresión de la maquinaria invasiva-degradativa que caracteriza a la célula metastásica (Thiery y Chopin 1999).

La degradación de la matriz extracelular es un proceso necesario tanto para la migración de las células endoteliales y mesenquimales como para la invasión y metástasis tumoral a distancia.

Una de las propiedades que determinan la capacidad invasiva, es la producción de proteasas que degraden la matriz extracelular (MEC) (Liu, Crepin y Col. 2002). Este concepto de célula invasiva-célula degradadora ha sufrido modificaciones con la descripción (para la familia de serín-proteasas de uroquinasa, uPA) de receptores de membrana (uPAR) donde la enzima localizaría su actividad proteolítica pericelular y además activaría una ruta de señalización que, dependiendo del tipo celular, constituye un estímulo para la proliferación o la migración (Andreasen, Egelund y Col. 2000; Blasi y Carmeliet 2002).

Junto a las proteasas de la familia uPA, la de las metaloproteasas, que incluyen las colagenasas, gelatinasas, metaloelastasa, estromelesina y matrisilina también desempeñan una función clave en el proceso invasivo tumoral (Liu, Crepin y Col. 2002).

La importancia de uPA en la invasión del tumor, la progresión maligna y la metástasis a distancia no sólo por está dada por la conversión del plasminógeno en plasmina, requisito previo para la degradación proteolítica de la matriz extracelular, la invasión

extracelular de la matriz y la migración de la célula, sino además por la capacidad del par uPA/uPAR para activar rutas de señalización (Guerrero, Santibanez y Col. 2004). Existe evidencia experimental abundante de que uPA desempeña un papel significativo en la metástasis maligna durante la progresión del tumor (Andreasen, Egelund y Col. 2000) y adicionalmente se ha reportado que existe un aumento de uPA y de su receptor, en muchos tumores humanos. De este modo, uPAR pasa a cumplir una función clave en el proceso metastásico dado su potencial de unir uPA generada desde diversas fuentes y desencadenar un conjunto de reacciones que estimulan la expresión del fenotipo invasivo (Kruger, Soeltl y Col. 2000). Los altos niveles de uPA y uPAR en tumores se asocian con un mal pronóstico de pacientes con cáncer de mama, pulmón, cabeza y cuello, cervico uterino, la vejiga, y el ovario (Reuning, Magdolen y Col. 1998).

La instalación de un potencial motogénico en una célula epitelial transformada supone una re-organización molecular que incluye múltiples componentes. Dentro de las moléculas que aportan al proceso migratorio, se incluyen entre muchas otras, los receptores de factores de crecimiento, las proteínas que participan en la unión intercelular (E-cadherina), en la unión a matriz (integrinas) y en la remodelación del citoesqueleto, como las Rho GTPasas (Thiery y Chopin 1999).

### **1.2. GTPasas de la Familia Rho.**

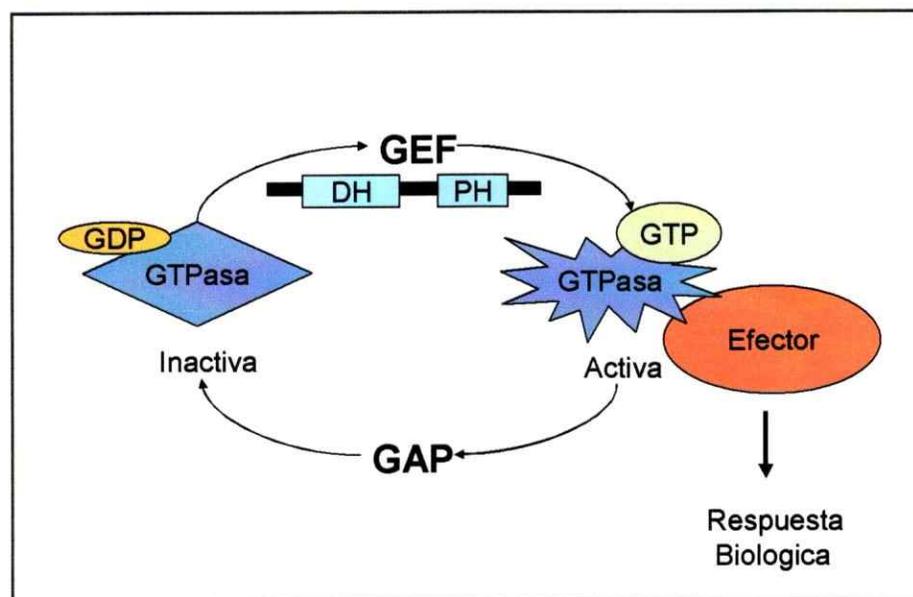
Las GTPasas de la familia Rho, son interruptores moleculares que controlan procesos celulares complejos usando una estrategia bioquímica simple. Para ello, requieren la capacidad de completar un ciclo entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP (ver Cuadro 1), bajo el estricto control de los activadores (factores intercambiadores de nucleótido guanina, GEF) y de los inactivadores (proteínas

activadoras de GTPasa, GAP) (Etienne-Manneville y Hall 2002). Hasta la fecha, la familia de las Rho GTPasas en mamíferos, contempla por lo menos a 20 miembros, dentro de las cuales las más estudiadas debido a su rol en la organización del citoesqueleto son: Rho, Cdc42 y Rac.

**Cdc 42**, que participa en la formación de filopodios, la adhesión célula-célula, la desaparición de las fibras de estrés.

**Rho**, que ha sido implicada en la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, morfología celular, agregación celular, motilidad celular, contracción de músculo esquelético y citoquinesis.

**Rac**, cuya activación está asociada a la formación de lamelipodios y es responsable de la motilidad celular, polimerización de actina y la adhesión célula-célula mediada por cadherinas. (Hall 1998; Kaibuchi, Kuroda y Col. 1999)



**Esquema # 1:** Ciclo de activación-Inactivación de las Rho GTPasas.

Además de la reconocida capacidad de estas proteínas de regular el citoesqueleto de actina durante los procesos de migración (Hall 1998), las Rho GTPasas también juegan un papel clave en la conducción de una variedad de otros procesos celulares, como por ejemplo la proliferación celular, la transformación, y la transcripción de genes (Caceres, Guerrero y Col. 2005). De hecho, participan, entre otros procesos, en la activación del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) (Perona, Montaner y Col. 1997; Montaner, Perona y Col. 1998), un grupo de factores transcripcionales, estructuralmente relacionados y evolutivamente conservados, implicados en la regulación de la expresión de los genes requeridos para las respuestas inflamatorias, el crecimiento celular, y supresión de la apoptosis (Ghosh, May y Col. 1998).

### **1.3. Estado Redox y Cáncer.**

La importancia del proceso inflamatorio como uno de los factores que predisponen el cáncer se refleja en la propuesta que un tercio de los cánceres puede ser atribuido a efectos de la inflamación crónica (Coussens y Werb 2002). No obstante la solidez de esta proposición, lo cierto es que actualmente, no existe un marco teórico que permita explicar los mecanismos moleculares que de cuenta de esta asociación causal. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) constituyen un conjunto de moléculas directamente asociada con la inflamación tisular que se han vinculado de modo directo con el proceso carcinogénico (Coussens y Werb 2002).

Se ha descrito que el cambio en el equilibrio redox intracelular provocado por un aumento transitorio de la concentración de ROS puede provocar la oxidación de proteínas, lípidos y DNA. El daño genómico expresado como alteraciones permanentes

(mutaciones puntuales, deleciones, etc.) que afecten en el largo plazo a proto-oncogenes o genes supresores es el fenómeno que de un modo más consensuado ha permitido vincular los procesos de inflamación y cáncer (Coussens y Werb 2002).

Desde el punto de vista del aporte de ROS a la célula epitelial, objeto tanto del fenómeno inflamatorio como de la transformación, el consenso tradicional es que éstos son originados por células de del sistema inmune, que migran al sitio inflamado y generan ROS prioritariamente a través de la actividad de una NAPH oxidasa (NOX) unida a membrana (Lambeth, Cheng y Col. 2000). No obstante, en la actualidad se acepta que isoformas de esta enzima también es posible encontrarlas en células de origen no hematopoiético, lo que abre la posibilidad de que la generación endógena de ROS por la propia célula epitelial juegue un papel central en el fenómeno de transformación (Banfi, Molnar y Col. 2001).

Al potencial generador de ROS propuesto para las NOX se agregan otros que incluyen la actividad de la 5'lipoxigenasa (LOX) originalmente descrita en linfocitos (Los, Schenk y Col. 1995), la "derivación" de electrones en la mitocondria hacia la formación de superóxido (Boveris, Oshino y Col. 1972) y los fenómenos adhesivo (Werner y Werb 2002) y de activación de receptores de tipo tirosina quinasa (Bae, Kang y Col. 1997) entre otros. Todos ellos, en mayor o menor medida, producen estallidos de ROS de duración y magnitud variable que provocan cambios significativos en rutas específicas de señalización.

#### 1.4. Las GTPasas de la familia Rho en la generación de ROS.

Las GTPasas de la familia Rho, en particular Rac, han sido sugeridas como piezas clave en la modulación de la respuesta celular a los cambios intracelulares de ROS (Werner 2004). La propuesta más aceptada para la acción de Rac en la producción de ROS se asocia con el hecho de que en su versión activa (Rac-GTP) constituye una subunidad de la NOX en células fagocíticas lo que permite que su activación (Rac2 en células fagocíticas) lleve asociada una elevación transitoria de las ROS (Bokoch y Diebold 2002). Como se mencionara, muchas células no fagocíticas expresan también isoformas de NOX cuya actividad también depende del nivel de activación de Rac (en este caso, Rac1) que producen niveles discretos de ROS intracelulares a los que se les ha asignado un rol importante en señalización celular (Werner 2004).

El estudio de la asociación entre la Transición epitelio-mesénquima (TEM), la activación de GTPasas y la producción de especies reactivas derivadas de oxígeno (ROS), ha generado un cuadro complejo de resultados que no permite aún establecer un mecanismo molecular único que de cuenta de la posible asociación entre los cambios en el equilibrio redox y la malignidad celular.

Se ha propuesto –por ejemplo– que la exposición prolongada de células mamarias murinas (NMuMG) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) produce una elevación del potencial invasivo secundario a un incremento de la producción/activación de MMPs (MMP-13 y MMP-3) y a un incremento de la activación de Rac1 (Mori, Shibamura y Col. 2004). Estos autores también analizan el efecto del  $H_2O_2$  en la producción de MMPs por células estromales llegando a la conclusión que la expresión de MMP-3 (Estromelina) es notablemente incrementada por el estímulo oxidativo exógeno. En un estudio más reciente (Radisky, Levy y Col. 2005), al exponer las células mamarias murinas SScp2 al

estímulo externo de MMP-3 se obtuvieron cambios fenotípicos y funcionales propios de la TEM, un aumento de la expresión de la isoforma de Rac1b y un consecuente aumento de la producción endógena de ROS. Los autores proponen que el efecto primario de la acción de MMP-3 es sobre Rac1b el que, a su vez, provoca un aumento de las ROS, fenómeno que gatilla un incremento en la expresión del factor de transcripción Snail que, finalmente, desencadena la TEM. El análisis de los datos contenidos en estos dos estudios realizados en células de similar origen, permite entonces deducir que, en el primer caso, la producción de ROS es necesaria para la activación de Rac y en el otro, por el contrario, la elevación de los ROS es la consecuencia de la activación previa de Rac.

### **1.5. La vía de NF $\kappa$ B.**

El factor de la transcripción NF $\kappa$ B se conoce por su función en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias. Sin embargo, datos recientes sugieren que NF $\kappa$ B también desempeña un papel clave en el control de la proliferación celular, la apoptosis, y la migración celular (Sun y Xiao 2003). La activación desregulada de NF $\kappa$ B ha sido observada en varios tipos de cáncer. Durante los últimos años, se ha hecho un significativo progreso en dilucidar los mecanismos de activación de NF $\kappa$ B en células normales y tumorales, encontrándose que una gran cantidad de proteínas quinasas pueden estimular la actividad de NF $\kappa$ B bajo diversas condiciones, y que algunas de estas quinasas se encuentran aberrantemente activadas en células tumorales (Sun y Xiao 2003).

En mamíferos, la familia de NF $\kappa$ B consiste de cinco miembros: Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105), y NF $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100). Estas moléculas son capaces de formar homo y heterodímeros, cuya forma mejor caracterizada, es un heterodímero integrado por las subunidades p50 y p65. (Fan y Maniatis 1991). La función de NF $\kappa$ B es regulada por una familia de proteínas inhibitorias, conocida como inhibidor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (Baldwin 1996). Una característica estructural común de las proteínas I $\kappa$ B es la presencia de un dominio de repetición de ankirina que media su asociación con NF $\kappa$ B (Rice, MacKichan y Col. 1992; Mercurio, DiDonato y Col. 1993). Hasta ahora, los miembros bien definidos de la familia de I $\kappa$ B incluyen I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p100, y p105 (Baldwin 1996). Estas proteínas inhibitorias funcionan bloqueando la translocación nuclear y la capacidad de unión al DNA de los NF $\kappa$ Bs.

Según sabemos, NF $\kappa$ B puede ser activado por una gran variedad de estímulos, tales como, citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, agentes dañinos al DNA, componentes bacterianos, y proteínas virales (Pahl 1999). Un paso principal en la activación de NF $\kappa$ B es la degradación de su I $\kappa$ Bs asociado, que permite a los dímeros de NF $\kappa$ B translocarse hacia el núcleo donde se une a secuencias reguladoras de sus genes blanco. (Huber, Azoitei y Col. 2004). Las señales que conducen a la activación de NF $\kappa$ B accionan una vía de transducción responsable de la fosforilación de I $\kappa$ Bs en dos residuos específicos de serina. La fosforilación permite la poliubiquitinación de I $\kappa$ Bs en residuos específicos de lisina y la subsecuente degradación proteolítica por el proteosoma 26S. Después de la degradación de I $\kappa$ Bs, el homo o heterodímero de NF $\kappa$ B está libre para desplazarse al núcleo y transactivar alguno de los genes blanco (Baldwin 1996).

La acción de NF $\kappa$ B puede activar genes implicados en diversas funciones celulares, tales como proliferación de la célula, inhibición de la apoptosis, adhesión celular, y migración de la célula (Pahl 1999). Bajo condiciones normales, las señales que median la activación de NF $\kappa$ B son transitorias, en virtud de las necesidades de proliferación y supervivencia programada de la célula. Sin embargo, la activación desregulada de NF $\kappa$ B puede contribuir al establecimiento de diversas etapas de la tumorigenesis (Rayet y Gelinas 1999; Baldwin 2001). De hecho, la activación constitutiva de NF $\kappa$ B ha sido detectada en una gran variedad de enfermedades en humanos, tales como, la enfermedad de Hodgkin (Bargou, Leng y Col. 1996), la leucemia linfoblástica aguda (Kordes, Krappmann y Col. 2000), el cáncer de mama (Nakshatri, Bhat-Nakshatri y Col. 1997; Sovak, Bellas y Col. 1997), el cáncer de colon (Lind, Hochwald y Col. 2001), el cáncer ovárico (Huang, Robinson y Col. 2000), el cáncer de la próstata (Palayoor, Youmell y Col. 1999), el cáncer del hígado (Tai, Tsai y Col. 2000), y en melanomas (Meyskens, Buckmeier y Col. 1999; Yang y Richmond 2001). Un papel esencial de NF $\kappa$ B en el crecimiento y la supervivencia de las células malignas ha sido demostrado por numerosos estudios, observándose una contribución directa en la oncogenesis y también en la resistencia de las células del cáncer a las terapias anticáncer (Barinaga 1996; Wang, Mayo y Col. 1996; Iwanaga, Mori y Col. 1998).

Considerando que las distintas modificaciones que sufre una célula para alcanzar un estado maligno, se deben en parte a la pérdida de las uniones celulares y/o a la activación de rutas de señalización que conducen a la expresión de la maquinaria degradadora de matriz extracelular, en este trabajo de tesis, pretendemos estudiar el papel que cumple Rac1, un proteína clásicamente asociada al reordenamiento del

citoesqueleto, en la adquisición de características propias del fenotipo maligno. Partiendo de la base, de que en nuestro sistema Rac1 en su forma activa es parte esencial del complejo NOX, se formulo la siguiente hipótesis.

## 2. HIPÓTESIS.

El estado de activación de la GTPasa Rac1, determina la conducta invasiva de células epiteliales mamarias humanas, a través de la modulación de los niveles intracelulares de las especies reactivas derivadas de oxígeno (ROS).

## 3. OBJETIVOS.

**3.1. General:** Asociar la actividad de la GTPasa Rac1, con la producción de especies reactivas derivadas de oxígeno (ROS) e identificar algunos mecanismos celulares que median la influencia del equilibrio redox en la adquisición de propiedades invasivas en células tumorales humanas.

### 3.2. Específicos:

Obtener clones que sobre-expresan la versión dominante negativa de Rac1 (RacN17) evaluando la actividad de la GTPasa mediante ensayos de pulldown.

Caracterizar en los clones RacN17 la expresión, distribución y funcionalidad de la Cadherina-E y asociar estos datos con la motilidad celular.

Analizar y evaluar en células transfectadas transitoriamente con distintas formas de Rac1 (RacN17 y RacV12) funciones celulares asociadas con la capacidad invasiva de las células y la producción intracelular de ROS.

Evaluar la influencia de la actividad de Rac en la actividad de la vía de NF $\kappa$ B, el posible rol de los ROS en la activación de ésta vía y el papel de NF $\kappa$ B en la expresión de uPA y en la capacidad invasiva de estas células.

Evaluar la participación de la NADPH Oxidasa, en la producción de ROS intracelular.

#### 4. MATERIALES.

##### 4.1. Instrumentos y equipos:

Los instrumentos y equipos utilizados para realizar todos los procedimientos necesarios para dar respuesta a la hipótesis planteada son: Campana de bioseguridad forma Scientific modelo 1129; Incubador Lab-Line CO<sub>2</sub> automático; Cámaras de transferencia Bio-Rad, Centrifuga Biofuge prime R Heraeus; Microscopio de fluorescencia Nikon labophot-2; Microscopio invertido de contraste de fase Nikon modelo TMS-F y Lector de ELISA modelo Elix-806. Fluorometro Spectra MAX, Gemini EM, Molecular Devices; Luminometro MGM instrument, OPTOCOMP-P; Termociclador TECHNE, TC-312.

##### 4.2. Reactivos:

- DMSO, Hepes, NEM, Temed,  $\beta$ -mercaptoetanol, Albumina de Suero Bovino (BSA), Matrigel, Glicina, TEMED, Tris, Acrilamida, Bis-acrilamida, Agarosa, Glutation Sepharosa y Ortovanadato de sodio (SIGMA-Aldrich, st Louis, MO).
- Formaldehído, Glicina, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Cloruro de Sodio, Bicarbonato de Sodio, Cloruro de Magnesio, Cloruro de Potasio, Fosfato dibásico de Potasio, (Merck Damstadt, Alemania).
- Metanol y Ácido Acético (TCL, Chile).
- Membranas PDVF y estándar de peso molecular preteñido broad range (BioRad).
- Antibióticos Penicilina - Estreptomina y Fungizona (GIBCO).
- Leupeptina hemisulfato, Pepstatina A (US Biological).

- Oligo dT 12-18 Primer, Taq DNA Polimerase, Recombinant, TRIzol Reagent, dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, dTTP 100 mM, LipofectAMINE 2000, (Invitogen, Carlsbad, CA).
- M-MLV Reverse transcriptase, Luciferase-assay system E1500, (Promega, Madison, WI).
- 50 pb y 100bp DNA Lader, (New England BioLabs).
- Plasmid Maxiprep Kit (E.Z.N.A.).
- Matrigel (Becton-dickinson).
- Galacto-Light Plus System (Applied Biosystems, Bedford, MA).

#### 4.3. Anticuerpos generales:

- **Policlonales:** anti Rac1 (Cytoskeleton, Denver, CO).
- **Monoclonal:** anti Cadherina-E (Calbiochem, San Diego, CA).
- **Secundario:** anti conejo conjugado con peroxidasa y anti ratón conjugado con peroxidasa IgG (Rockland, Gilbertsville, PA).
- **Inmunofluorescencia:** anti ratón conjugado a FITC (SIGMA-Aldrich, st Louis, MO).

## 5. MÉTODOS.

### 5.1. Cultivo celular.

Células MCF-7 provenientes de cáncer mamario (adquiridas en ATCC<sup>1</sup>, Manassas, VA, USA) fueron cultivadas en ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>, con medio de cultivo DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) con una dosis de Gentamicina de 2 mg/L (Best Pharma) que se renovó cada dos días. Las células se subcultivaron antes que alcanzaran la confluencia por tratamiento con Tripsina-EDTA (Gibco) seguida de una corta incubación con suero fetal para frenar la actividad proteolítica.

### 5.2. Crio-preservación de las células.

Las células se liberaron de la placa con tripsina-EDTA (Gibco), en la cual se agregó 4 volúmenes del medio de cultivo y se centrifugaron durante 5 minutos a 1800 rpm. El pellet resultante se resuspendió con mezcla de criopreservación (90% suero fetal bovino y 10% DMSO) a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL. Se distribuye 1 mL de la solución en criotubos rotulados y se congela mediante el descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar  $-196$  °C. Las células criopreservadas se almacenan sumergidas en el N<sub>2</sub> líquido.

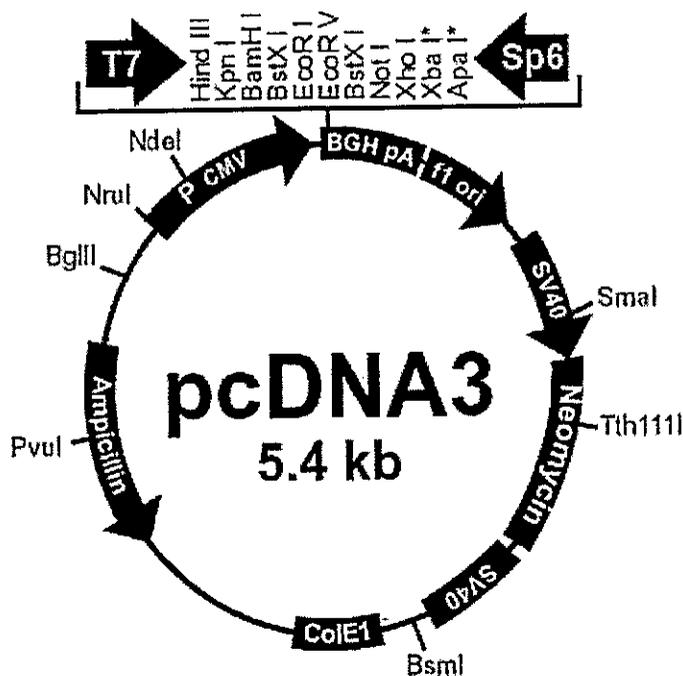
---

<sup>1</sup> American Type Culture Collection

### 5.3. Método de transfección:

En placas de 35 mm, se transfectaron 400.000 células con 2  $\mu\text{g/mL}$  de plasmidio utilizando el método de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este consiste en preparar una mezcla DNA:Lipofectamina en una proporción 1:3 y ponerla a interactuar por 15 minutos, luego agregarla sobre las células e incubarla por 6 horas. Luego de la incubación con la mezcla DNA:Lipofectamina, las células son lavadas y cultivadas en el medio con 10 % suero fetal por 48 horas. Luego de este tiempo son utilizadas para realizar los experimentos.

Los vectores utilizados fueron construidos en el plasmidio pcDNA3 (5,4kb) al cual se le agregaron las formas mutantes de la proteína Rac1: permanentemente activa (RacV12) o dominante negativa (RacN17), las cuales fueron donadas por Alan Hall (Self y Hall 1995). Como control se utilizó el vector vacío pcDNA3 (Esquema # 2).



**Esquema # 2:** Esquema del Plasmidio en el que se clonó la forma permanentemente activa y dominante negativa de Rac1.

En adelante las células obtenidas de la selección de clones y que portan la versión dominante negativa de Rac1, se denominarán **DN** acompañadas del número del clon y las células transfectadas de manera transitoria con la versión activa y dominante negativa de Rac1 se nombrarán como **RacV12** y **RacN17** respectivamente. Por su parte las células transfectadas con el vector vacío se llamarán **VV** y corresponderán a las células controles.

#### **5.4. Separación de la GTPasa por ensayo de pull-down.**

Este procedimiento tiene por objeto separar la fracción de GTPasas en su forma activa de la población total. Para ello, se recurre a la afinidad por efectores específicos de la forma activa (unida a GTP) de la GTPasa respectiva. En el caso de Rac1 utilizamos un fragmento de PAK fusionada con Glutación Transferasa (PBD-GST).

**Obtención proteína de fusión PBD-GST.** Las bacterias DH5a (Amp<sup>R</sup>) con el plásmido que contiene el cDNA de la proteína de fusión fueron donadas por el Dr. Keith Burrige (University of North Caroline).

Las bacterias que contenían el plásmido pGEX4T fueron crecidas a 37°C con agitación en 40 mL de medio LB que contenía 100 µg/mL del antibiótico de selección Ampicilina durante toda la noche. Luego el cultivo se amplificó a un volumen final de 500 mL con el mismo medio de cultivo creciendo hasta una DO<sub>600</sub> de 1,8. Luego, las bacterias se indujeron con 0,3 mM IPTG por 16 horas. Finalmente, las bacterias se separaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se resuspenden en 10 mL de tampón de lisis B (50 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1% Tritón X-100 y 10 µg/ml de Aprotinina y Leupeptina). El lisado

bacteriano se sonicó 6 veces por 20 segundos y se centrifugó a 4 °C por 10 minutos a 12000 rpm. El volumen total del sobrenadante que contenía la proteína de fusión se incubó mediante rotación por una hora con 1 mL de Glutation Sefarosa diluida al 50% en PBS, se lavó 3 veces en tampón de lisis B, luego 2 veces con tampón de lisis B sin Tritón X-100 y se almacenó en 50% glicerol a -70 °C.

### **Ensayo de Actividad de Rac:**

Cultivos de  $1,2 \times 10^7$  células, fueron sembrados en dos placas de 100 mm e incubados en ausencia de suero por 12 horas. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con tampón (Hepes 20 mM pH 7,4, NaCl 0.15M) para luego ser lisadas con tampón A (50 mM Tris pH 7,6, 500 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% DOC, 1% Tritón x-100, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> e inhibidores: 1 mM PMSF, 10 ug/mL Leupeptina y 10ug/mL Aprotinina). A continuación, el lisado se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se incubó en rotación a 4 °C por una hora con la proteína de fusión purificada previamente y unida a Glutación-Sefarosa. Luego de esta incubación se separó la fracción de lisado unida a Sefarosa por centrifugación durante 1 minuto a 1400 rpm, se lavó 2 veces con tampón de lisis y luego se mezcló con tampón de carga concentrado (4x). La mezcla se calentó por 5 minutos a 100 °C y el sobrenadante se cargó en un gel al 15 % SDS-PAGE siguiendo el protocolo convencional de un Western Blot el que se reveló con un anticuerpo monoclonal anti Rac1.

### 5.5. Western Blot:

Las células fueron raspadas desde la placa de cultivo con un volumen pequeño de tampón C (Hepes 50mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, 10% glicerol, 1% Tritón x-100, MgCl<sub>2</sub> 2mM e inhibidores de proteasas: PMSF 0.15 mg/mL, Ortovanadato 2 mg/mL, Leupeptina 5µg/mL y Pepstatina 10µg/mL).

La concentración de proteínas de cada muestra se determinó por el método de Bradford y se normalizaron entre ellas por dilución. Cada muestra (con igual concentración de proteínas) se les agregó tampón de carga 4X con 1% de β-mercaptoetanol. La mezcla se calentó a 100 °C por 5 minutos, se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se cargó en un gel SDS-PAGE que se corrió a 80 V hasta pasar el gel concentrador y luego a 120 Volt el gel separador. Dependiendo del tamaño de la proteína a identificar, la transferencia se realizó en lapsos entre 1 hora a 100 V o 12 horas a 30V. Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con leche o BSA al 5%, después se incubó con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios conjugados con peroxidasa. El revelado de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit de Pierce.

### 5.6. Inmunofluorescencia:

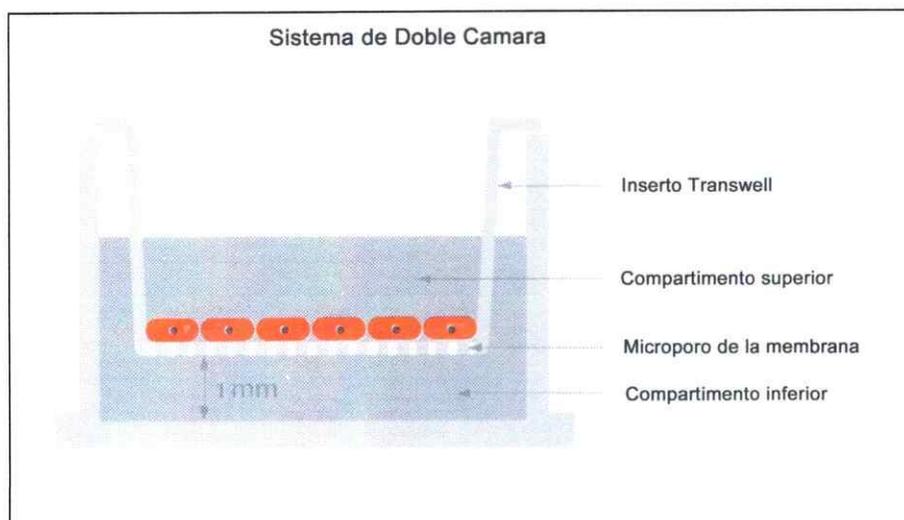
Células controles y células RacN17 fueron sembradas sobre cristales de vidrio redondos de 13 mm durante 24 horas a 37 °C. A continuación, las células se lavaron una vez con PBS y posteriormente se fijaron con paraformaldehido 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Con el propósito de permitir el acceso del anticuerpo al interior de la célula, éstas se permeabilizaron con Tritón X-100 0.025% durante 2 minutos. Luego se realizaron 2 lavados con PBS y se bloqueó durante una hora con

BSA 5% en PBS. Posteriormente se incubaron los cristales con el anticuerpo primario diluido en BSA al 1% en PBS, durante una hora. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS durante 10 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con FITC también disuelto en BSA al 1% durante otra hora. Finalmente, los cristales se montan sobre un portaobjeto con una gota de reactivo de montaje (Kodak) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

### **5.7. Ensayo de invasión:**

Con el propósito de evaluar la capacidad invasiva de las células, utilizamos el ensayo de invasión en cámaras Transwell (Corning, NY) con tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  (esquema # 3). El filtro poroso de las cámaras se incubó previamente durante 12 horas con 10  $\mu\text{g}$  de Matrigel (Becton-dickinson) y luego se sembraron en él,  $5 \times 10^4$  células en medio libre de suero y en contacto con la proteína de MEC. Las células se dejaron migrar por 36 horas bajo el estímulo quimiotáctico del medio suplementado con 10% de SFB en el compartimiento inferior de la cámara Transwell. Concluido este tiempo las células se fijaron en una solución de metanol y cristal violeta por 10 minutos y se lavo con agua para retirar el exceso de colorante.

Luego se eliminaron por raspado, todas las células que no migraron y finalmente se fotografiaron cuatro campos de cada filtro, con las que se determino por conteo directo, el número de células teñidas con cristal violeta. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose un promedio de células por campo, para cada condición del experimento. (Nguyen, Hussaini y Col. 1998).



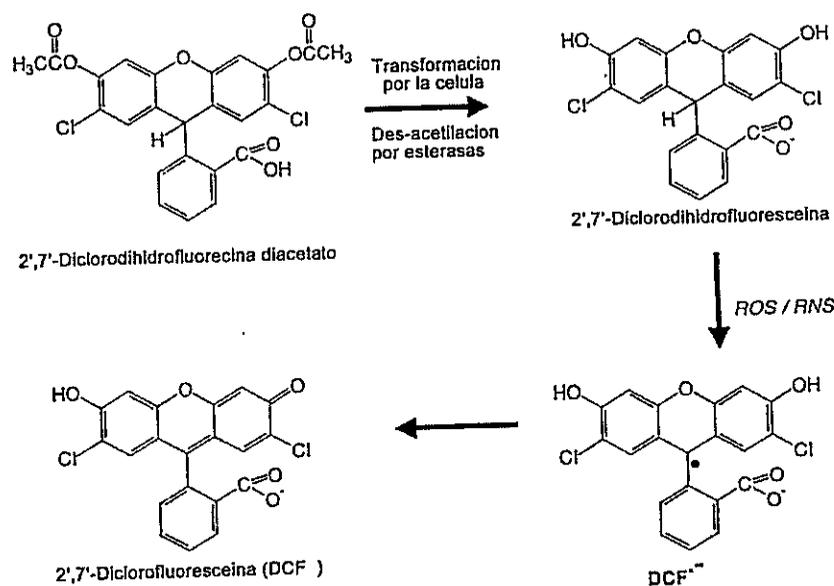
**Esquema # 3.** Sistema de doble cámara en el cual se realizaron los ensayos de invasión.

### 5.8. Ensayo de Agregación:

Células MCF-7 wild-type y el clon DN1 se liberaron de la placa con tratamiento con trispsina/EDTA y luego de la neutralización, se diluyen hasta una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente las células fueron sembradas e incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por dos horas en placas de 96 pozos previamente tratadas con una solución de leche 5% y abundantemente lavadas con PBS 1X. Luego de este tiempo se agregan  $100\text{ }\mu\text{L}$  de PBS 1X a cada pozo y las células se pasan 3 veces por una punta de pipeta de 1000. A continuación las células se transfieren a una placa de 48 pozos que contiene  $250\text{ }\mu\text{L}$  de paraformaldehído al 6% en PBS 1X y se fijan por 10 minutos. Cuando las células se han fijado se toman alícuotas de cada pozo y se ponen en una cámara de Neubauer para su conteo. Se tomaron cuatro alícuotas de cada pozo y cada condición se realizó por cuadruplicado.

### 5.9. Determinación de ROS.

Células controles o previamente transfectadas con las distintas formas de Rac (RacN17 y RacV12) fueron sembradas en placas de 96 pozos y cultivadas por 24 horas a 37 °C, en presencia o ausencia de NAC, DPI y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se mantuvieron en medio de cultivo DMEN-F12 sin suero y sin rojo fenol por media hora. Posteriormente se reemplazo por el mismo medio suplementado con 2,7-Dicloro-dihidro-fluorecin-diacetato (DCHF-DA), uno de las moléculas más usadas como indicador del estado redox intracelular (Halliwell y Whiteman 2004). La DCHFDA se incubo por media hora, luego de los cual se lavaron las células nuevamente con PBS 1X y se lisaron en NaOH 0,2 N por 5 minutos. Finalmente se paso el lisado a una placa de 96 pozos especial para mediciones fluorométricas (Fluoronunc) y se cuantificó la intensidad de fluorescencia a  $\lambda$  480 nm de excitación,  $\lambda$  530 nm emisión y  $\lambda$  495 nm de autocat (Halliwell y Whiteman 2004).



**Esquema # 4.** Conversión de la Diclorodihidrofluoreceina-diacetato (DCHF-DA) en Diclorofluorecina (DCF'), indicador fluorescente del estado redox intracelular.

### 5.10. Ensayos de actividad transcripcional, utilizando un gen reportero.

#### Actividad del promotor de Uroquinasa.

Células MCF-7 fueron sembradas en placas de 24 pozos e incubadas a 37°C hasta 60% de confluencia, luego las células fueron lavadas con PBS 1X y cotransfectadas en medio DMEM/F12 sin suero ni antibiótico por 5 hrs, con 2,0 µg/mL de una mezcla de DNA. Dicha mezcla contiene 0.8 µg/mL de vector reportero puPA-Luc cuyos controles son pGL2 (C-) y pSV40-Luc (C+), 0,2 µg/mL de vector para β-galactosidasa y 1,0 µg/mL con alguna de las formas de Rac. pN17Rac1 (dominante negativo de Rac1) ó pV12Rac1 (Rac1 permanentemente activo) cuyo control es pCDN3 (VV). Para la transfección se utilizó el método de LipofectAMINA 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Luego de 48 hrs las células fueron lisadas para medir actividad luciferasa, que es proporcional al grado de actividad del promotor de uPA y β-galactosidasa, que se utilizo como control de transfección. La intensidad luminosa se determino por luminómetro y se expresa unidades relativas de luz (URL).

#### Actividad de la vía de NFκB.

Células MCF-7 fueron sembradas en placas de 24 pozos e incubadas a 37°C hasta 60% de confluencia, luego las células fueron lavadas con PBS y cotransfectadas en medio DMEM/F12 sin suero ni antibiótico por 5 hrs, con 2,0 µg/mL totales de una mezcla de DNA. Dicha mezcla contiene 0,8 µg/mL de vector reportero pNFκB-Luc cuyos controles son pGL2 (C-) y pSV40-Luc (C+), 0,2 µg/mL de vector para beta-galactosidasa y 1,0 µg/mL con alguna de las formas de Rac, pRacN17 (dominante negativo de Rac1) ó pRacV12 (Rac1 permanentemente activo) cuyo control es pCDN3 (VV). Para la transfección se utilizó el método de lipofectAMINA 2000 reagent

(Invitrogen, Carlsbad, CA). Luego de 48 hrs después de la transfección las células fueron lisadas para medir actividad luciferasa. Como control de transfección se determino actividad  $\beta$ -galactosidasa por medio de un luminómetro.

Adicionalmente para la evaluación de la actividad de la vía NF $\kappa$ B en respuesta al estado redox se transfectaron células MCF-7 con el sistema reportero pNF $\kappa$ B-Luc y luego de 24 horas de la transfección se trataron con distintos agentes modificadores del estado redox (NAC, DPI y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Protocolo para la medición de Luciferasa (Luciferase-assay system E1500).**

- Remover el medio de cultivo.
- Lavar las células 2 veces con PBS 1X.
- Lisar por 5 minutos con 50  $\mu$ L de buffer de lisis.
- Centrifugar y recolectar el sobrenadante.
- Agregar 20  $\mu$ L del lisado a 50  $\mu$ L de sustrato y mezclar bien.
- Luego medir en luminómetro.

**Protocolo para la medición de  $\beta$ -Gal (Galacto-Light Plus System):**

- Tomar 10 $\mu$ L del lisado y agregan 50  $\mu$ L de sustrato previamente diluido 1:100.
- Incubar por 45 minutos y luego se agrego 75  $\mu$ L de acelerador.
- Mezclar bien y medir en luminómetro.

### 5.11. RT-PCR:

#### **Aislamiento de RNA:**

**Homogenización:** las células fueron sembradas en placas de 35 mm y luego de la transfección o de terminado el tratamiento por 48 horas, fueron lisadas agregando 1 mL de Trizol y homogenizando mediante el pasó del lisado varias veces por la punta de una micropipeta de 1000  $\mu$ L.

**Separación inicial:** se incubó el homogenizado por 5 minutos a temperatura ambiente luego se agregó 200  $\mu$ L de cloroformo se tapó cada tubo y se agitó enérgicamente por 15 segundos, dejando incubar nuevamente por 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos, luego de cual la muestra queda dividida en tres fases: la inferior de color rojo (fase de fenol-cloroformo), una interfase y la superior sin color y acuosa, en donde se ubica el RNA.

**Precipitación del RNA:** Se traspasó la fase acuosa de la muestra a un tubo nuevo y se precipita el RNA presente mezclando con 500  $\mu$ L de alcohol isopropílico. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugaron a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. El RNA precipitado se observó como un pellet tipo gel.

**Lavado del RNA:** se removió el sobrenadante con 1 mL de etanol al 75 %, se mezcló en Vórtex y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4 °C.

**Redisolución del RNA:** se secó completamente el pellet de RNA colocando los tubos a temperatura ambiente y se disolvió el RNA en agua libre de nucleasas pasándolo varias veces por la punta de una micropipeta. La concentración del RNA se evaluó espectrofotométricamente y se almacenó a -80 °C.

**Síntesis de cDNA:**

Se tomaron 2  $\mu\text{g}$  de RNA y se mezclaron con 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT 50  $\mu\text{M}$  y agua libre de nucleasa en cantidad suficiente para alcanzar un volumen de 15  $\mu\text{L}$ , esta mezcla se calentó durante 5 minutos a 72  $^{\circ}\text{C}$ , para luego dejar en hielo durante 3 minutos. Posteriormente se agregó 5  $\mu\text{L}$  de búfer de enzima 5x, 1,5  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0,8  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa 200 U/ $\mu\text{L}$  y agua libre de nucleasas hasta completar 25  $\mu\text{L}$  de volumen de reacción. Finalmente se realizó la síntesis de cDNA a 42  $^{\circ}\text{C}$  por una hora. Una vez obtenido el cDNA de cada muestra, se hizo una dilución 1/100 (en agua libre de nucleasas) y se leyó en un espectrofotómetro para conocer la concentración de cDNA obtenida en cada muestra. El cDNA se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Obtención de productos por PCR:**

En tubos de PCR de 0,2 mL, se agregaron 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP 10mM, 0,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 2,5  $\mu\text{L}$  de búfer de PCR 10X, 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq 5 U/ $\mu\text{L}$ , 0,2  $\mu\text{g}$  de cDNA, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer 10 pmol/ $\mu\text{L}$  y agua libre de nucleasa en cantidad suficiente para completar 25  $\mu\text{L}$  de reacción.

Tabla # 1. Partidores para RT-PCR.

Proteína	Partidores	Tm	Nº ciclos	Producto (pb)
GPDH	5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'	62°	25	456
Cadherina E	5' TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA 3' 5' TGA CTC CTG TGT TCC TGT TA 3'	56°	31	500
Snail	5' TTC CAG CAG CCC TAC GAC CAG 3' 5' GCC TTT CCC ACT GTC CTC ATC 3'	64°	31	206
MMP-1	5' TCC AAG CCA TAT ATG GAC GTT 3' 5' ACT TCA TCT CTG TCG GCA AAT 3'	58°	29	255
Uroquinasa	5' GCA GGA ACC CAG ACA ACC G 3' 5' GAC CCA GGT AGA CGA TGT AG 3'	58°	29	357

#### 5.12. Test Estadístico.

La significancia estadística fue determinada, utilizando el test de T Student. Los valores de  $P < 0,05$  fueron aceptados como estadísticamente significativos.

## 6. RESULTADOS.

### I. Generación de clones estables que sobre-expresan una versión dominante negativa de Rac1 (Rac1N17).

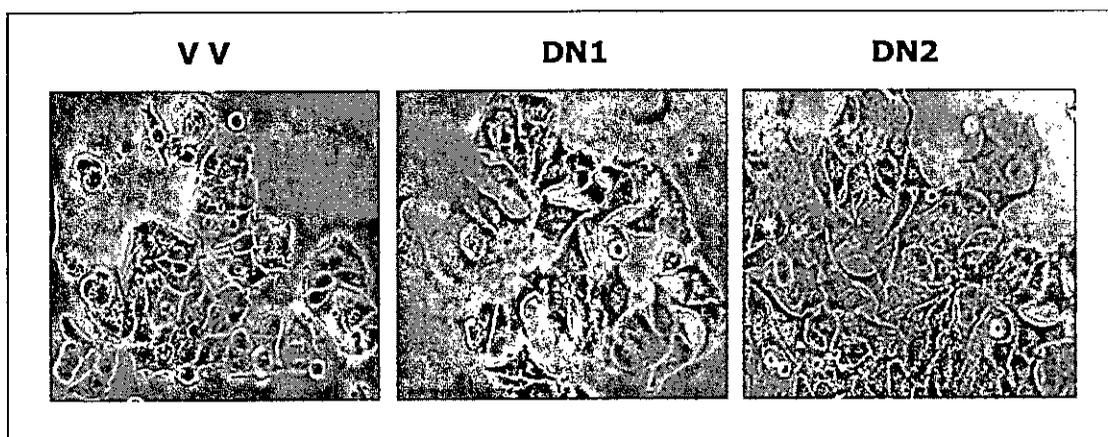
La sobre-expresión de Rac ha sido identificada como un factor de mal pronóstico en los tumores de mama invasivos. (Sahai y Marshall 2002). Con el propósito de estudiar los mecanismos moleculares dependientes de Rac que subyacen a la adquisición de propiedades invasivas, transfectamos en forma estable células MCF-7, que si bien conservan predominantemente características de células epiteliales, muestran algunos rasgos de célula invasiva.

Para la obtención de células que sobre-expresan la forma dominante negativa de Rac1, se transfectaron células MCF-7 con un plasmidio pcDNA3 que contenía el cDNA de Rac1N17. Esta versión de la proteína, que porta una mutación que le confiere a la molécula la incapacidad de unir GTP, resulta en una acumulación de la forma inactiva unida a GDP.

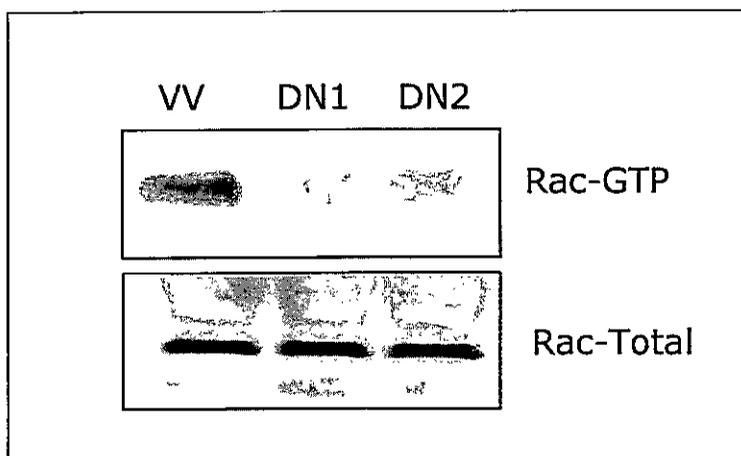
Luego de transfectadas, las células fueron seleccionadas al agregar en el medio de cultivo 1 mg/mL de G418 durante 3 semanas. En los clones resultantes (identificados como DN) comprobamos el efecto de la sobre-expresión de la proteína mutada, sobre la actividad de Rac1, mediante un ensayo de Pull-Down. En este ensayo, nos permite evaluar la fracción de Rac-GTP presente en las células respecto de Rac total. Un procedimiento similar se utilizó para la obtención de células controles que portaban un vector vacío (VV).

**Actividad de Rac1 en clones RacN17 en células MCF-7.**

**A**



**B**



**Figura 1. A.** Microfotografía de los clones seleccionados. **B.** Ensayo de Pull-Down para las células controles (VV) y los clones RacN17 (DN). La fila superior corresponde a la fracción de Rac1 activo (unido a GTP) y la inferior corresponde a la masa total de Rac1.

Del resultado de la Figura 1, podemos deducir que el procedimiento de transfección y posterior selección produjo 2 clones que al sobre-expresar efectivamente la proteína RacN17 presentan una reducción significativa de la fracción activa de la GTPasa Rac.

Esto permitió estudiar los efectos de la actividad de Rac en el fenotipo maligno, con una población de células con baja actividad de la GTPasa.

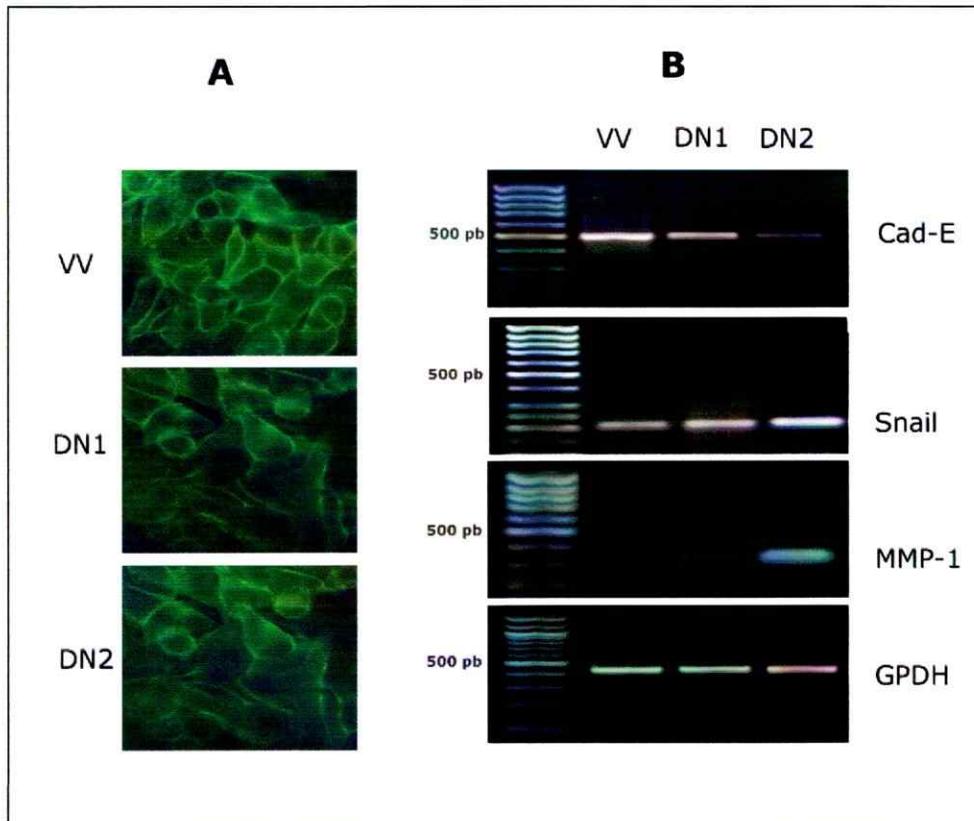
## **II. Caracterización fenotípico-funcional de los clones estables con la versión dominante negativa de Rac1 (RacN17).**

### **A. Expresión y localización de Cadherina-E.**

El nivel de expresión de Cad-E en células epiteliales constituye un elemento limitante en la formación de complejos de adhesión célula-célula (Gumbiner 2000). En células normales, la transcripción basal de cadherina-E, está constitutivamente activa por un complejo transcripcional donde se combinan factores como RB, c-Myc o AP-2 (Batsche, Muchardt y Col. 1998). Esta activación constitutiva se considera un rasgo central en la expresión del fenotipo epitelial. Por su parte, factores nucleares como la Smad Interacting Protein (SIP1), E12/E47 o miembros de la familia de Snail, se unen al promotor de cadherina-E e inhiben su transcripción (Cano, Perez-Moreno y Col. 2000; Peinado, Marin y Col. 2004). La sobre expresión de Snail en células epiteliales provoca la desestabilización del aparato de adhesión celular e induce el proceso de transición epitelio-mesénquima en estas células (Batlle, Sancho y Col. 2000; Perez-Moreno, Locascio y Col. 2001).

Con el propósito de estudiar el efecto que los cambios en el nivel de actividad de Rac1 provocan en la adhesión célula-célula mediada por cadherina-E (Cad-E), evaluamos en los clones DN; la expresión y funcionalidad de Cad-E, la capacidad migratoria y la producción basal de uroquinasa. Adicionalmente, verificamos la expresión de Snail (represor transcripcional de la expresión de Cad-E) y la expresión de MMP-1, un gen blanco de la actividad de Snail.

**La sobre-expresión de RacN17 en células MCF-7 disminuye la expresión de Cadherina-E, sin afectar su localización.**



**Figura 2. A.** Inmunofluorescencia indirecta para Cadherina-E en células controles (VV) y en clones DN1 y DN2 (Aumento 100X). **B.** RT-PCR para: Cadherina-E (500 pb), Snail (206 pb), MMP-1(255 pb) y como control de carga GPDH (456 pb). De izquierda a derecha los carriles corresponden a: marcador de PM; células controles (VV); clones DN1 y DN2.

De la figura 2, podemos deducir que la sobre-expresión de la versión DN de Rac en células MCF-7, disminuye la expresión de Cadherina-E, sin afectar su localización. También observamos que la disminución de la expresión de Cad-E, es concordante con la expresión de Snail, principal elemento represor de su expresión. Adicionalmente, Snail es un factor de transcripción que modula la expresión de genes asociados a la TEM (De Craene, van Roy y Col. 2005) y en este caso su actividad transcripcional se verificó analizando la expresión del mRNA para uno de sus genes blanco que

corresponde a la metaloproteinasa 1 (MMP-1). Lo que como se observa en el RT-PCR de la figura 2B, es consistente con el aumento de Snail en estas células.

### B. Funcionalidad de las Cadherinas.

Con el propósito de evaluar si los cambios observados en la expresión de cadherina-E tienen un correlato funcional con la capacidad de interacción célula-célula, se realizó un ensayo de agregación, consistente en determinar el porcentaje de células que se agregan luego de transcurrido un tiempo en que éstas se mantienen en suspensión luego de ser liberadas del cultivo en presencia de un agente quelante de calcio.

Los clones RacN17 presentan una menor capacidad para formar agregados celulares, consistente con la disminución en la expresión de Cadherina-E.

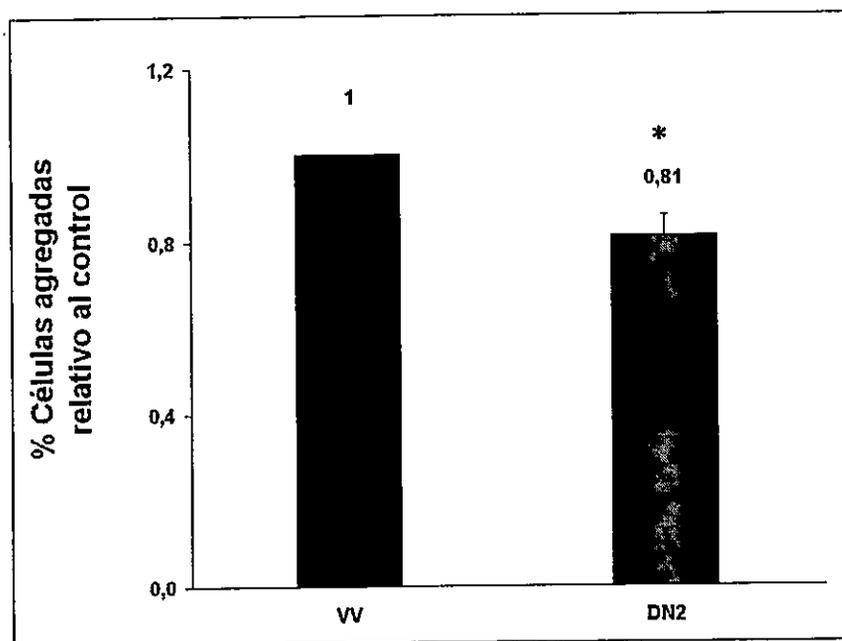


Figura 3. La grafica muestra el porcentaje de células Controles (VV) y DN2, agregadas después de 2 horas. Las barras corresponden a los promedios relativos al control y la barra de error corresponde al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control,  $p < 0,05$ .

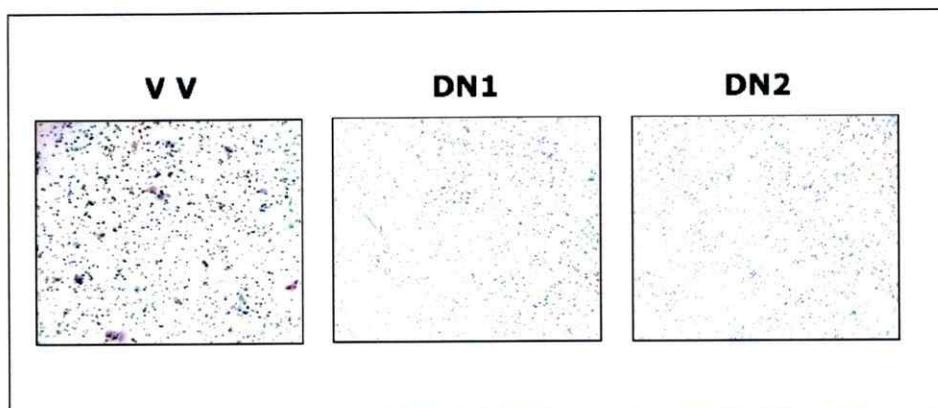
Como se observa en la figura 3, el clon dominante negativo utilizado en este ensayo, presenta una significativa reducción de la capacidad de formar uniones adherentes en suspensión que se correlaciona perfectamente con la baja expresión de Cadherina-E observada anteriormente. Los resultados anteriores sugirieron que la actividad de Rac1, participa en forma determinante en la interacción célula-célula, que es un elemento clave en la adquisición de capacidades migratorio-invasivas.

### **C. Evaluación de la capacidad migratoria.**

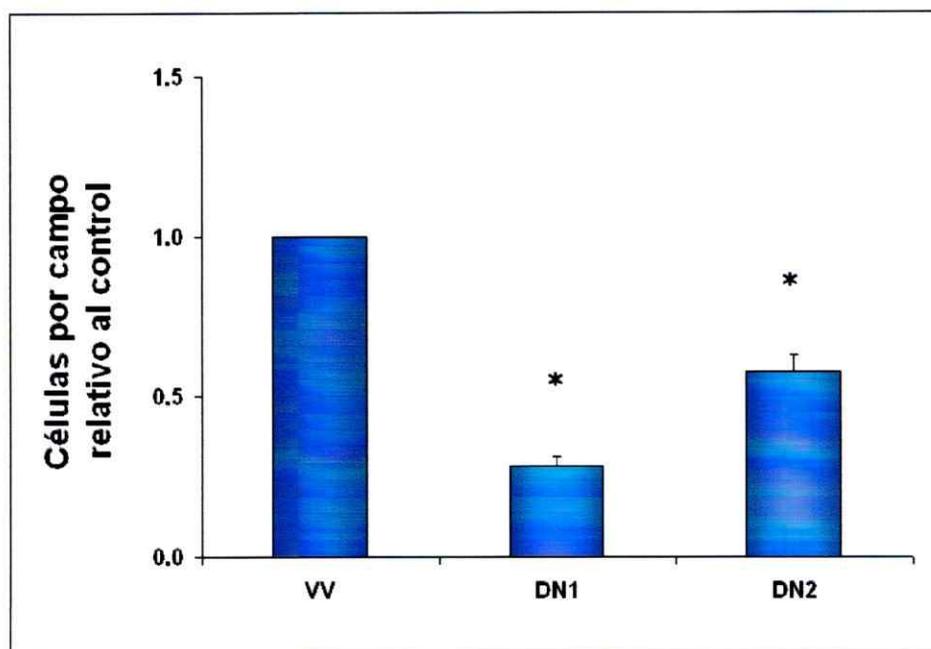
Dado que la capacidad migratoria en células tumorales es un elemento crucial para la adquisición de propiedades invasivas asociadas al fenómeno metastásico (Yoshioka, Nakamori y Col. 1999), quisimos evaluar si la actividad de Rac1 (que demostramos influye en la expresión de Cadherina-E) también jugaba un rol en la invasividad celular. La habilidad de las células para migrar a través de filtros constituye una buena aproximación a este fenómeno, pues la célula debe poner en operación sus sistemas de modificación de la arquitectura celular y -de ser necesario- activar la maquinaria de degradación de matriz extracelular para conseguir el movimiento.

Los clones que sobre-expresan Rac1N17 presentan una menor capacidad invasiva respecto de las células controles.

A



B



**Figura 4.** Ensayo de invasión en insertos bicamerales (Transwell) para células controles (v) y células dominante-negativas para Rac1 (DN). En A, se muestran microfotografías de las células en el lado inferior de los filtros que representan, por tanto, las células que migraron en el tiempo de duración del ensayo. En B, las barras corresponden al promedio de células por campo, relativo al control y las barras de error corresponden al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

La figura 4 muestra que las células que sobre-expresan la versión dominante negativa de Rac1, poseen una menor capacidad migratoria que las células controles transfectadas con el vector vacío. Este resultado se contrapone a lo esperado en virtud de lo observado anteriormente en el ensayo de agregación celular, puesto que se esperaría que células que se agregan menos expresaran una mayor capacidad migratoria.

Los cambios identificados en la capacidad migratoria sugieren que otros rasgos fenotípicos propios de las células invasivas también pueden estar siendo regulados por la actividad de Rac, por lo cual evaluamos si una de las proteasas involucradas en la maquinaria degradativa estaba siendo afectada.

#### **D. Determinación de la expresión de Uroquinasa (uPA).**

La degradación de la matriz extracelular es un proceso necesario tanto para la migración de las células endoteliales y mesenquimales como para la invasión y metástasis tumoral a distancia. Este fenómeno está comandado por una batería de proteasas, dentro de las cuales se le ha atribuido gran importancia a las metaloproteinasas B (MMP-9) y Uroquinasa (uPA) (Liu, Crepin y Col. 2002). Teniendo en cuenta la importancia del sistema Uroquinasa y la reducida capacidad invasiva que observamos en las células dominante-negativas, es que quisimos estudiar la influencia de la actividad Rac1 sobre la expresión de esta proteína.

Los clones dominante negativos de Rac1 presentan una expresión reducida de Uroquinasa consistente con la reducida capacidad migratoria.

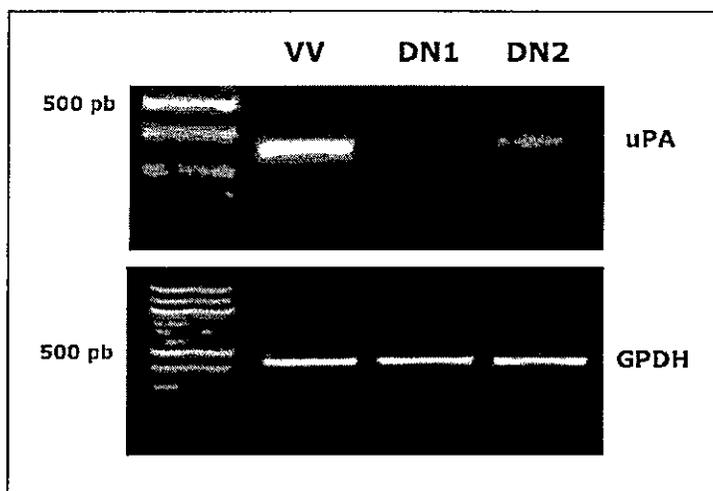


Figura 5. RT-PCR para uPA (357 pb) y GPDH (452 pb). De izquierda a derecha los carriles corresponden a: marcador de PM; células controles; clones DN1 y DN2.

Como observamos en la figura 5, los clones que expresan la forma dominante negativa de Rac1 presentan una menor expresión de uPA, lo que se correlaciona con la menor capacidad invasiva observada en estas células. Los resultados presentados previamente indican que la actividad de Rac estaría relacionada con el control de propiedades celulares directamente asociadas con el fenotipo invasivo.

### **III. Efecto de la actividad de Rac1 sobre propiedades asociadas al fenotipo invasivo.**

Con el propósito de ampliar los resultados obtenidos con los clones estables que expresan la versión dominante negativa de Rac1, decidimos estudiar un conjunto de propiedades fenotípicas de estas mismas células **provocando un aumento y/o una disminución de la actividad de Rac1**. Para ello, transfectamos las células de manera transitoria con una versión permanentemente activa (RacV12) y con la utilizada anteriormente RacN17.

#### **A. Evaluación de la capacidad invasiva.**

Dado que la disminución de la actividad de Rac1 provoca una menor capacidad invasiva de las células, esperamos que la sobre-expresión de la versión permanentemente-activa de Rac1 provoque un efecto contrario. Para verificar este supuesto, repetimos el ensayo de invasión en Transwell, ahora con células transfectadas transitoriamente con ambas versiones de Rac1.

La actividad de Rac1 modula la capacidad invasiva de células mamarias humanas MCF-7.

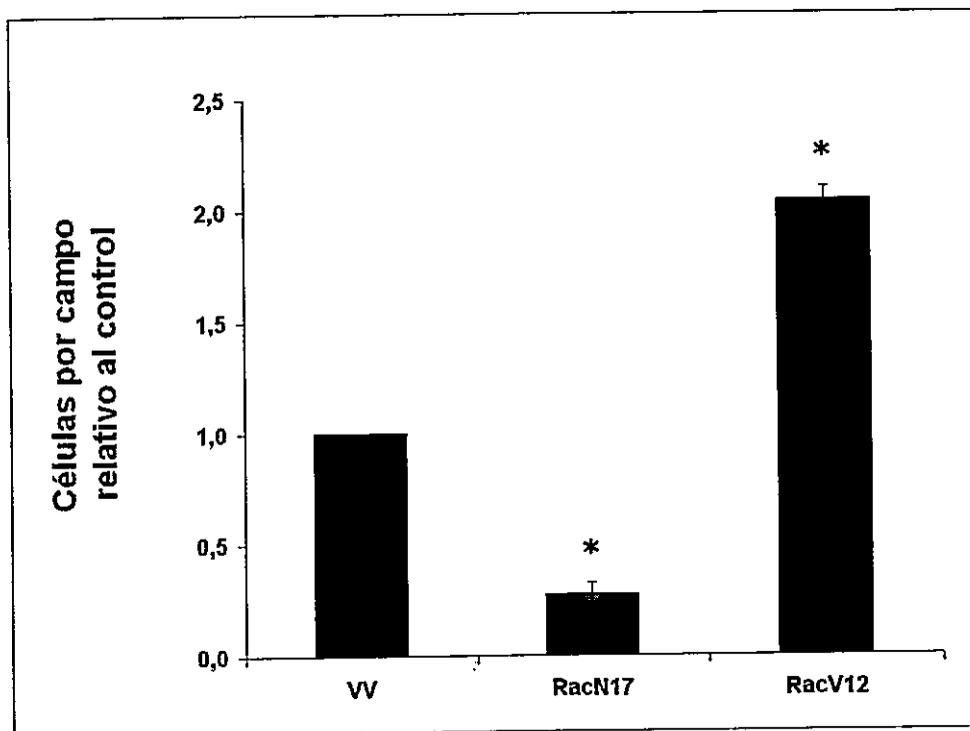


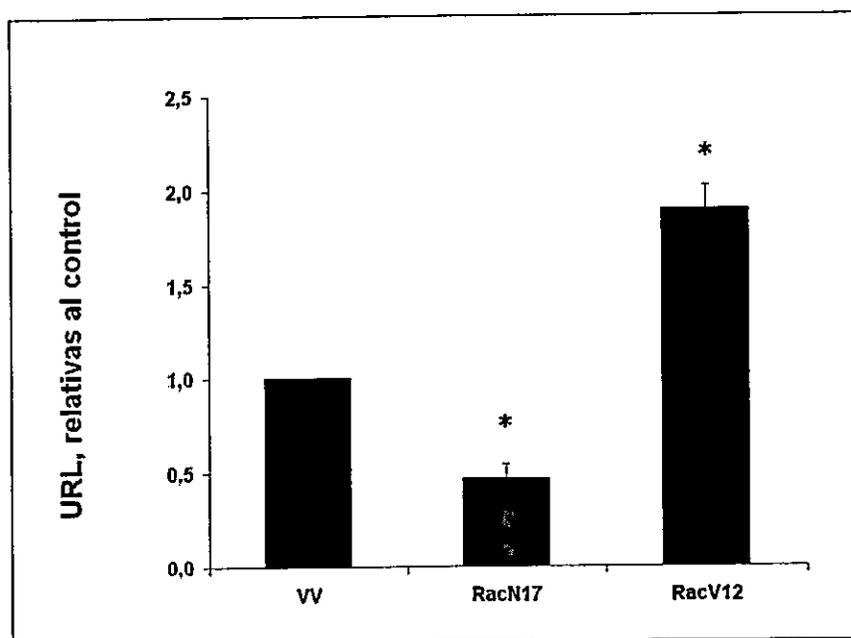
Figura 6. Ensayo de invasión en insertos bicamerales (Transwell) para células controles (VV), células dominante-negativas (RacN17) y células permanentemente-activas (RacV12). El gráfico muestra el promedio de células invasivas por campo, relativos al control y la barra de error corresponde al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

La Figura 6 muestra que, en forma consistente con lo observado en los clones DN, la actividad de Rac1 modula la capacidad invasiva de estas células, asociándose una mayor actividad de Rac con una mayor capacidad migratoria.

### B. Medición de la actividad del promotor de Uroquinasa (uPA).

Dado que la capacidad invasiva se ha asociado directamente con la expresión/actividad de uPA (Andreasen, Egelund y Col. 2000; Rabbani y Mazar 2001), evaluamos, en las células que expresan transitoriamente las versiones Dominante Negativa (RacN17) y permanentemente activa de Rac1(RacV12), la actividad del promotor de uPA. Para ello, co-transfectamos células MCF-7 que expresan las distintas formas de Rac (N17 y V12), con el vector "uPA promoter pGL2" construcción que contiene la secuencia del promotor de uroquinasa, unida al gen que codifica para luciferasa, lo que permite evaluar la actividad transcripcional del promotor de uPA.

#### Rac1 modula la actividad del promotor de Uroquinasa.



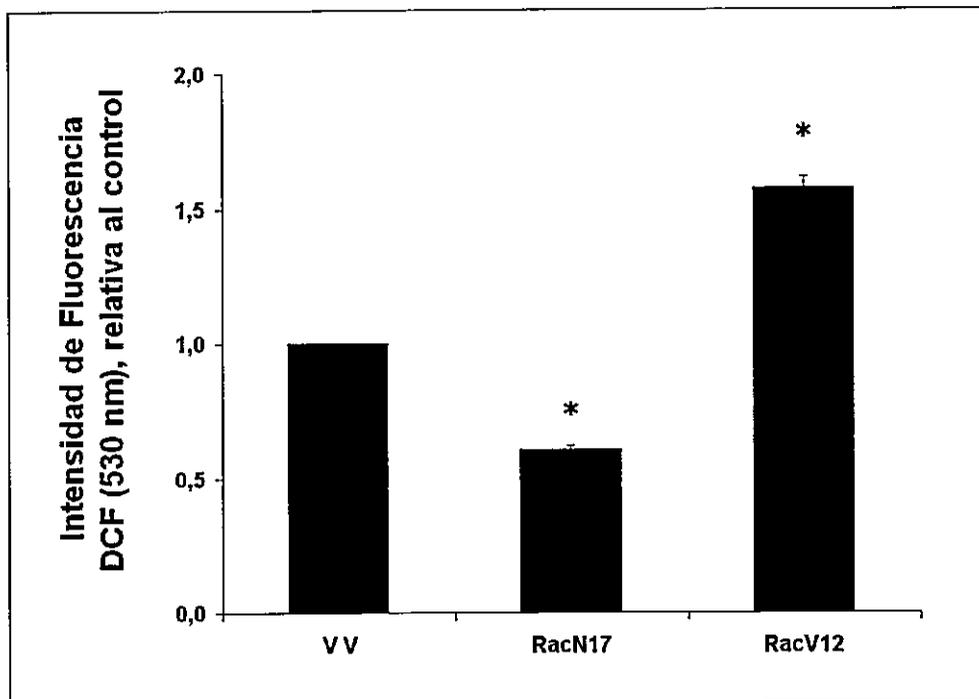
**Figura 7.** Actividad del promotor de uPA utilizando una construcción que contiene como gen reportero luciferasa. Las barras representan el promedio de las unidades relativas de luz, relativas al control, para las células VV, RacN17 y RacV12. La actividad luciferasa fue medida en un luminómetro y normalizadas con B-Gal. La barra de error corresponde al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control (VV)  $p < 0,05$

El resultado presentado en la figura 7 demuestra que la actividad transcripcional del promotor de uPA es regulada por la actividad de Rac1, lo que representa una respuesta muy similar a la obtenida en la figura 6 para la capacidad invasiva.

### **C. Determinación de la producción de especies reactivas derivadas de oxígeno (ROS), en células con distintos niveles de actividad de Rac.**

Se ha descrito que en células fagocíticas Rac constituye una subunidad del complejo NADPH oxidasa (NOX), enzima directamente involucrada en la generación endógena de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Werner 2004; Hordijk 2006). En células no fagocíticas, como las epiteliales, se ha postulado que un fenómeno similar podría ocurrir teniendo, en este caso, a Rac1 como elemento regulador de la actividad de la NOX en la producción de ROS (Werner 2004). Con el propósito de evaluar si la actividad de Rac es capaz de modular los niveles endógenos de ROS, transfectamos transitoriamente células MCF-7 con RacN17, RacV12 y VV, luego evaluamos fluorométricamente los niveles intracelulares de ROS según como se describe en materiales y métodos.

La actividad de la GTPasa Rac1 determina el nivel endógeno de ROS.



**Figura 8.** Determinación de los niveles de ROS utilizando DCFDA, en células controles (VV), células que expresan la versión dominante negativa (RacN17) y permanentemente activa (RacV12) de Rac1. Las barras muestran el promedio de las intensidades de fluorescencia ( $\lambda$  530 nm), relativas al control y las barras de error, corresponden al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$

Como se observa en la figura 8, la capacidad productora de ROS evaluada por fluorescencia está directamente asociada con la actividad basal de Rac. Si bien no podemos asegurar que la fuente productora de ROS sea NOX, al menos este resultado permite suponer que, corriente abajo de Rac, existen mecanismos celulares en los que la participación de especies reactivas de oxígeno pueden jugar un papel.

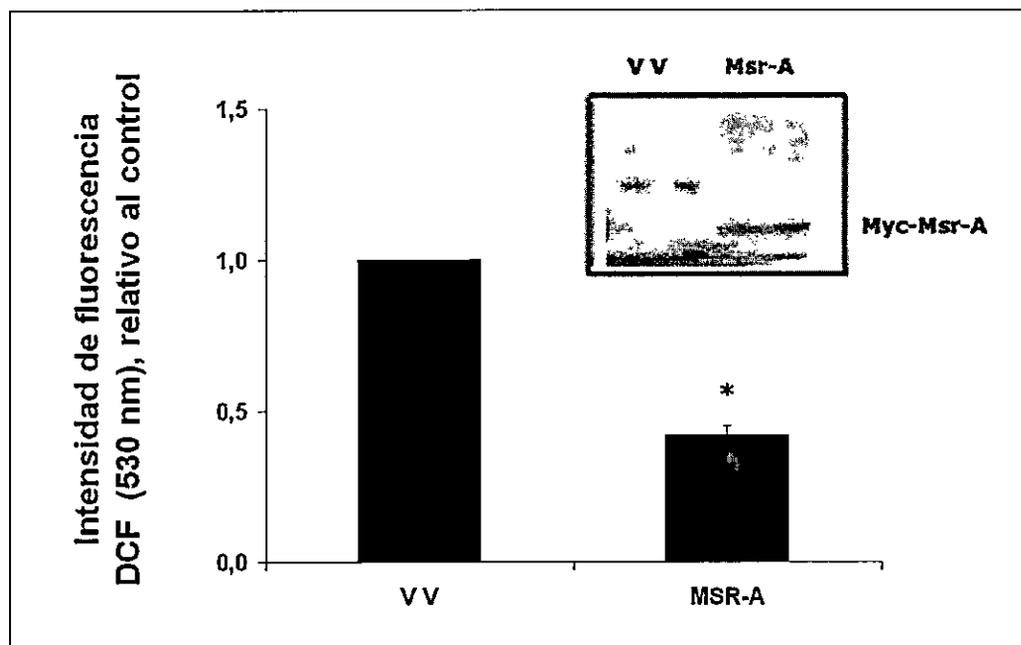
#### **IV. Correlación entre los niveles de ROS y la capacidad migratoria.**

##### **A. Efecto de antioxidantes en la migración celular.**

Con el objetivo de estudiar si los cambios en los niveles endógenos de ROS determinan la capacidad invasiva de células MCF-7, analizamos el efecto que tienen sobre la motilidad celular dos agentes que disminuyen el estado redox intracelular. Para ello utilizamos N-acetyl cysteina (NAC) y Metionyl sulfonyl reductasa A (Msr-A), enzima que al reducir las metioninas oxidadas reestablece la proporción de sustratos (metioninas) susceptibles de ser oxidados lo que provoca una baja en los niveles de ROS.

Previo a este experimento, evaluamos la capacidad de Msr-A de modular los ROS en nuestras células para lo cual transfectamos células MCF-7 con un plasmidio que codifica para Msr-A y medimos el nivel intracelular de ROS, utilizando DCHFDA del mismo modo que en el experimento anterior.

La sobre expresión de la proteína MsrA reduce los niveles intracelulares de ROS.

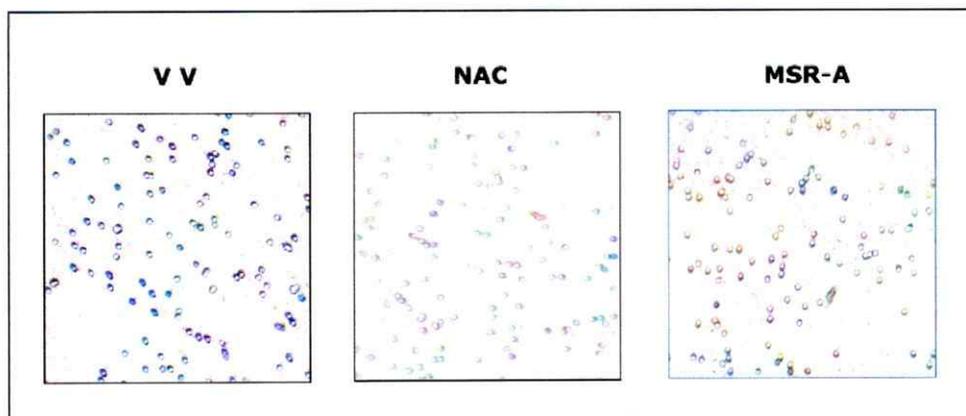


**Figura 9.** Cuantificación de los niveles intracelulares de ROS utilizando DCFDA, para las células MCF-7 controles (VV) y transfectadas con Msr (Msr-A). La grafica muestra el promedio de las intensidades de fluorescencia DCF' (530 nm), relativo al control y las barras de error corresponden al error estándar. Adicionalmente se muestra un WB para Myc-MsrA, para verificar la expresión de la proteína en las células transfectadas. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

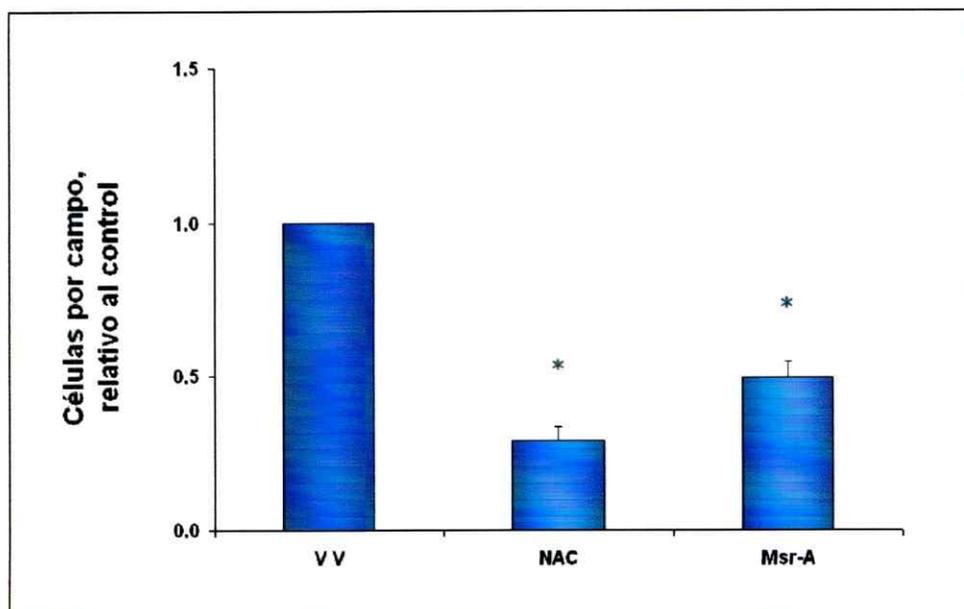
En la figura 9, observamos que en las células MCF-7 la sobre-expresión de Msr-A reduce significativamente los niveles intracelulares de ROS. Posteriormente, sometimos a un ensayo de invasión en Transwell, tanto a las células transfectadas con MsrA como a las tratadas durante el ensayo de invasión con N-acetyl cysteina (NAC), un conocido atrapador de ROS permeable a la célula.

La reducción de los niveles intracelulares de ROS disminuye la capacidad invasiva de células epiteliales.

A



B



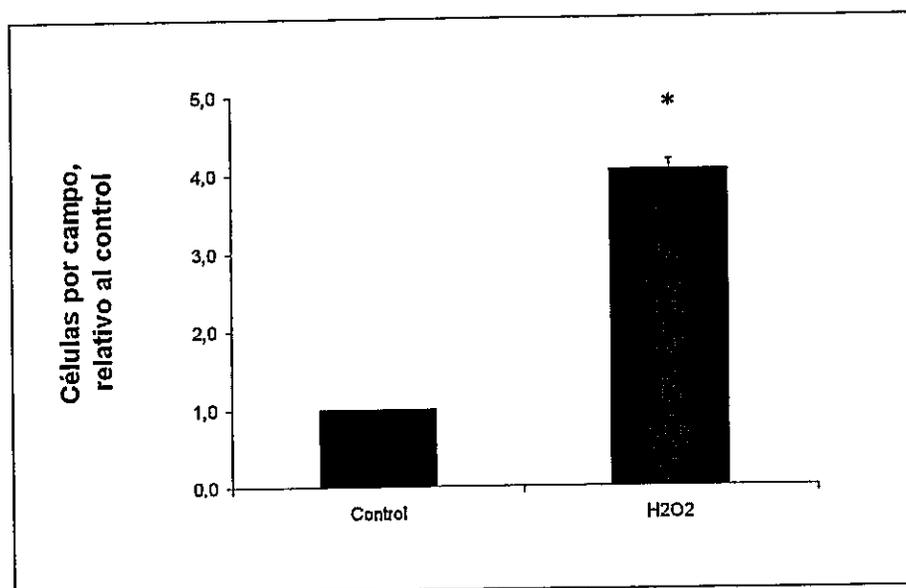
**Figura 10.** Ensayo de invasión en insertos bicamerales (Transwell). Las células controles (vv), células transfectadas con Msr-A y células tratadas con N-acetyl cysteina 10  $\mu$ M (NAC), durante 48 hrs. En **A**, se muestran microfotografías de las células en el lado inferior de los filtros que corresponden a las células que migraron en el tiempo que dura el ensayo. **B** El grafico muestra el promedio de células por campo relativo al control y la barra de error corresponde al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control,  $p < 0,05$ .

Como observamos en la figura 10, el cultivo de células MCF-7 con ambos agentes reduce marcadamente la capacidad invasiva de estas respecto a las controles. Esto sugiere que el equilibrio redox juega un papel en la adquisición de propiedades invasivas por parte de la célula.

### B. Efecto de un agente oxidante, en la migración celular.

Con el propósito de identificar a continuación si el aumento de los niveles intracelulares de ROS promueve la capacidad invasiva, evaluamos el efecto de un agente generador de ROS, como el  $H_2O_2$  sobre la migración celular. Para ello, pre-tratamos células MCF-7 durante 36 horas con  $H_2O_2$  50  $\mu M$  y luego evaluamos su motilidad en insertos bicamerales.

**El tratamiento con peróxido de hidrogeno aumenta la capacidad invasiva de células epiteliales.**



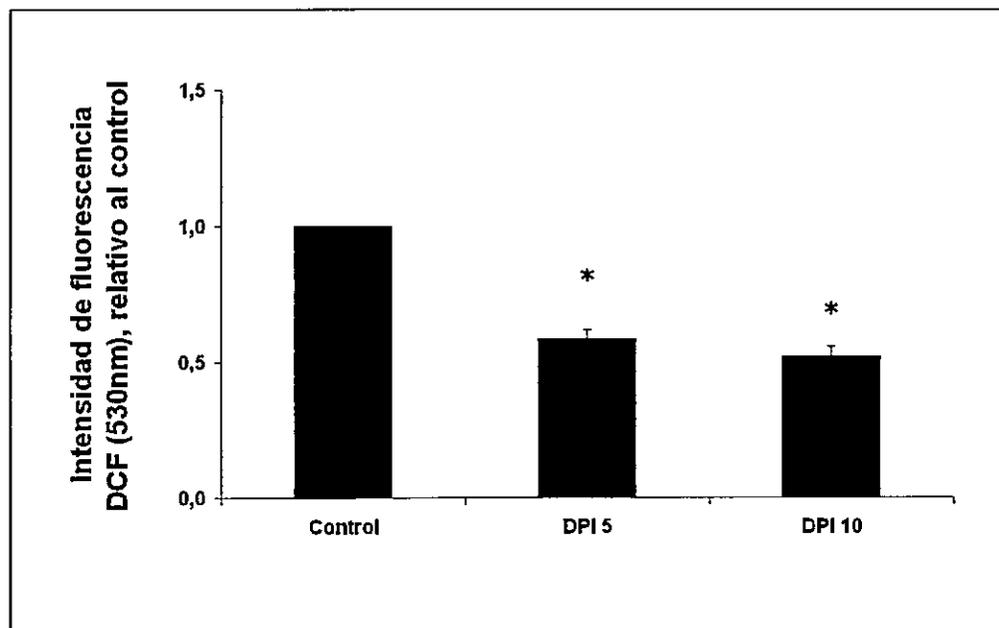
**Figura 11.** Ensayo de invasión en insertos bicamerales (Transwell) para células controles y células pre-tratadas con  $H_2O_2$  50  $\mu M$  durante 36 horas, dejadas a invadir durante 36 horas. El grafico muestra el promedio de células por campo, relativas al control y la barra de error corresponde al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

Los datos mostrados en la figura 11 muestran que las células tratadas con peróxido de hidrogeno, presentan un significativo aumento de su capacidad de invasión en comparación con las células no tratadas. Este resultado en conjunto con el anterior, sugieren que en nuestras condiciones experimentales, la migración celular es dependiente del estado redox. Esto asociado a los datos anteriores, que mostraban que el nivel de actividad de Rac determina la producción endógena de ROS, nos permite sugerir que la actividad de Rac modula la capacidad invasiva a través de la producción de ROS.

### **C. Evaluación de la participación de NOX en la generación de los ROS.**

La participación de Rac en el control de los niveles intracelulares de ROS se ha asociado directamente a la participación de la GTPasa en el complejo NAPH oxidasa (NOX). Para evaluar si los niveles de ROS en estas células estaban determinados por la actividad de NOX, evaluamos la producción de ROS por DCHF-DA en células sometidas a concentraciones crecientes de diphenyleneiodonium (DPI), un reconocido inhibidor de la NADPH oxidasa.

La producción de ROS intracelular depende de la actividad de la NADPHoxidasas.



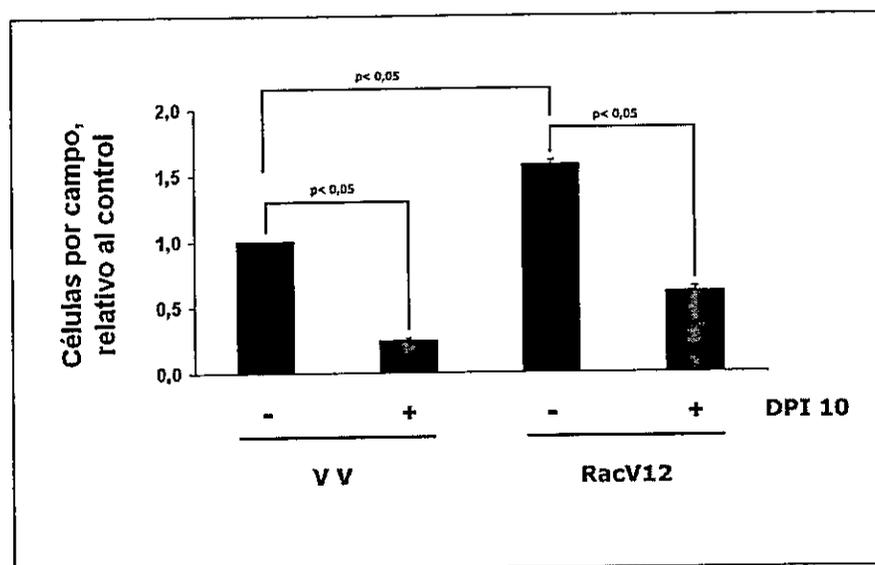
**Figura 12.** Cuantificación de los niveles de ROSm utilizando DCFHDA. En células MCF-7 controles y tratadas con DPI 5 y 10  $\mu$ M. La grafica muestra el promedio de las intensidades de fluorescencia DCF' (530 nm), relativos al control y las barras de error corresponden al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

De los resultados presentados en la figura 12, es posible sugerir que, al igual como ocurre en las células fagocíticas, el complejo NOX tendría un rol importante en la generación basal de ROS. Como una manera de asociar el aumento de la capacidad invasiva, promovida por la actividad de Rac con la participación de la GTPasa en el complejo NOX, responsable de la producción de ROS, analizamos el efecto de DPI sobre la invasividad, en células controles y transfectadas con RacV12.

### V. Evaluación del papel de NOX en la invasividad dependiente de la actividad de Rac1.

Con el propósito de evaluar la participación de NOX en la generación de ROS promotores de la invasividad celular, sometimos a tratamiento con DPI tanto a células transfectadas con el VV como aquellas transfectadas con la forma activa de Rac, que habían mostrado una mayor capacidad invasiva.

NOX participa en la producción de ROS que promueve Rac y que modula la capacidad invasiva.



**Figura 13.** Evaluación de la capacidad invasiva de células MCF-7 transfectadas con vector vacío (VV) y con la versión activa de Rac (RacV12) en presencia y ausencia de DPI 10  $\mu$ M. La grafica muestra el promedio de células invasivas por campo, referidas al control (VV sin inhibidor) y las barras de error corresponden al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

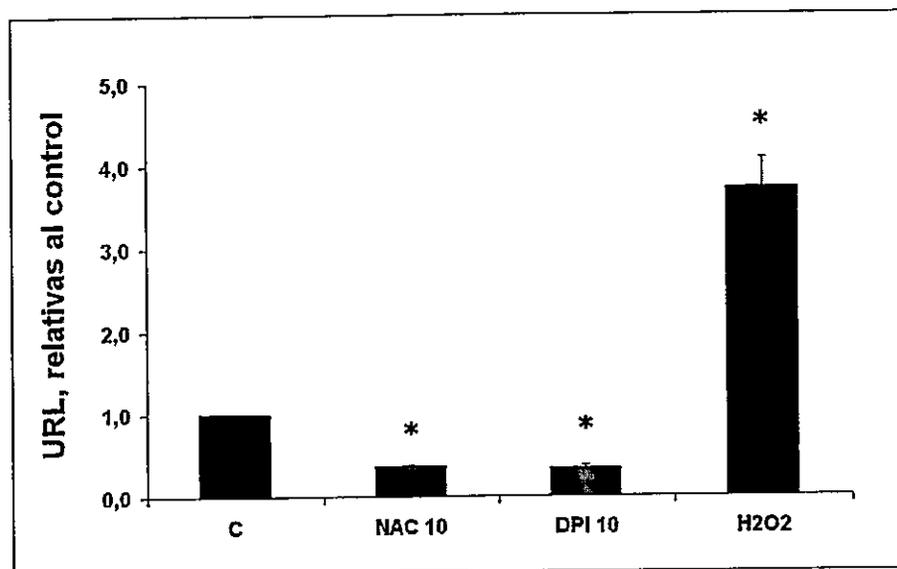
Estos resultados (Figura 13) sugieren que un porcentaje significativo de la invasividad asociada a la actividad permanente de Rac y que depende de la producción endógena de ROS es sensible a DPI y por tanto, sugieren fuertemente la participación de NADPH oxidasa.

## VI. Evaluación de la participación de NF $\kappa$ B en la señalización de Rac mediada por ROS.

### A. Efecto de los ROS en la activación de la vía NF $\kappa$ B.

Es un hecho conocido que uno de los principales blancos transduccionales de los ROS a nivel intracelular, es el sistema NF $\kappa$ B (Gloire, Legrand-Poels y Col. 2006). Con el propósito de verificar que en este sistema celular las modificaciones del estado redox intracelular afectan el nivel de activación de la vía de NF $\kappa$ B evaluamos el efecto de distintos agentes moduladores del estado redox, sobre la activación de NF $\kappa$ B.

**La actividad de la vía de NF $\kappa$ B es modulada por ROS.**

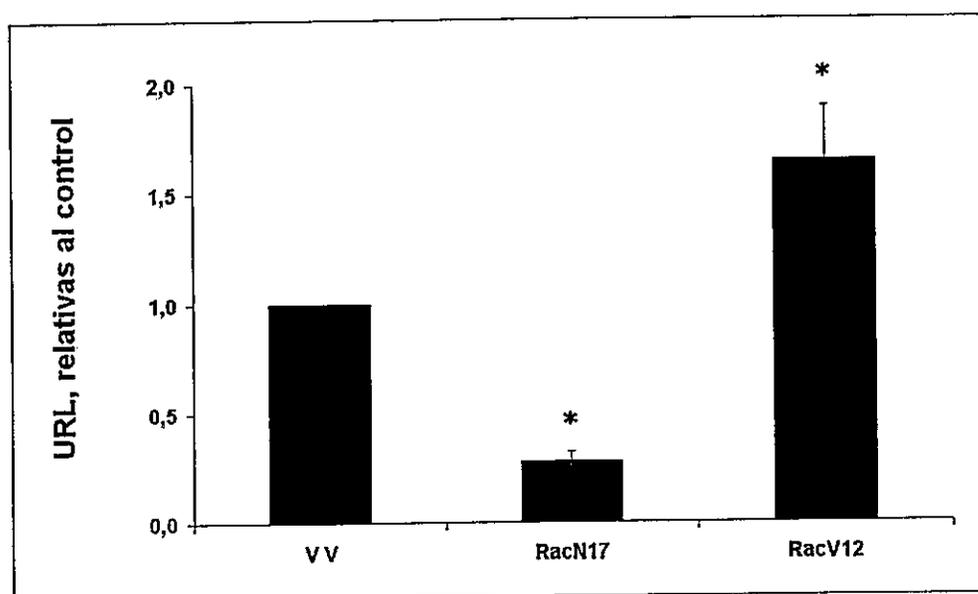


**Figura 14.** Determinación de la activación de la vía NF $\kappa$ B utilizando un constructo con luciferasa. La actividad luciferasa fue medida en un luminómetro y normalizada con  $\beta$ -Gal. Las barras corresponden al promedio de las unidades relativas de luz (URL) relativos al control, para cada uno de los distintos tratamientos: células tratadas con N-acetyl cysteina 10 mM (NAC), células tratadas con 10  $\mu$ M de DPI y células tratadas con Agua Oxigenada 50  $\mu$ M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La barra de error corresponde al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

### B. La actividad de Rac es capaz de modular la vía de NF $\kappa$ B.

Basados en los datos del experimento anterior, evaluamos si la actividad Rac1 –que provoca cambios a nivel del tenor oxidativo celular- también ejerce cambios en la actividad NF $\kappa$ B. Para ello, transfectamos en forma transitoria células MCF-7 con RacN17, RacV12 y evaluamos la actividad de NF $\kappa$ B a través de una co-transfección con un constructo reportero luciferasa (pNF $\kappa$ B-luc), que contiene 5 repeticiones en tandem de la secuencia de unión para NF $\kappa$ B.

#### Rac1 modula la actividad de la vía de NF $\kappa$ B.



**Figura 15.** Determinación de la activación de la vía NF $\kappa$ B utilizando un constructo con luciferasa. La actividad luciferasa fue medida en un luminómetro y normalizada con  $\beta$ -Gal. Las barras corresponden al promedio de las unidades relativas de luz (URL), relativas al control, para cada una de las células: controles (VV), dominante-negativas de Rac1 (RacN17) y células permanentemente-activas de Rac1 (RacV12). La barra de error corresponde al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

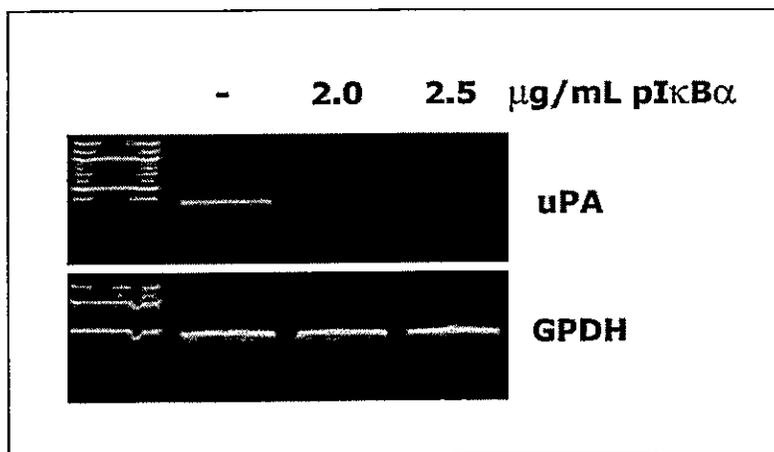
En la figura. 15, se observa que el nivel de actividad de Rac1 se correlaciona directamente con la actividad de la vía de NF $\kappa$ B, asociándose una mayor actividad de la GTPasa con una mayor actividad de dicha vía. Como observamos en las figuras 14 y 15, la actividad basal de NF $\kappa$ B es modulada tanto por los niveles de ROS como por la actividad de Rac. Esto sugiere –dado que Rac modula los niveles de ROS- que la modulación de NF $\kappa$ B está dada primariamente por la actividad Rac, expresada en la célula como cambios en la producción endógena de ROS.

Finalmente, con el propósito de investigar si los cambios en la conducta invasiva y la producción de uPA modulados por Rac requieren de la participación del sistema NF $\kappa$ B, transfectamos en células MCF-7 intactas, el vector pl $\kappa$ B $\alpha$  que codifica para el inhibidor principal del desplazamiento nuclear de NF $\kappa$ B y posteriormente analizamos la expresión de uPA y la capacidad invasiva de las células.

### **C. Evaluación de la expresión de uPA, en función de la actividad de NF $\kappa$ B.**

Datos previos indican que la expresión de uPA es sensible a los cambios en el estado redox intracelular (Santibanez, Frontelo y Col. 1999). Para estudiar si esta regulación depende de cambios en la vía de NF $\kappa$ B analizamos la expresión de uPA por RT-PCR en células transfectadas con distintas concentraciones de un vector que codifica para el represor de NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ).

La expresión de uPA es dependiente de la actividad de NF $\kappa$ B.



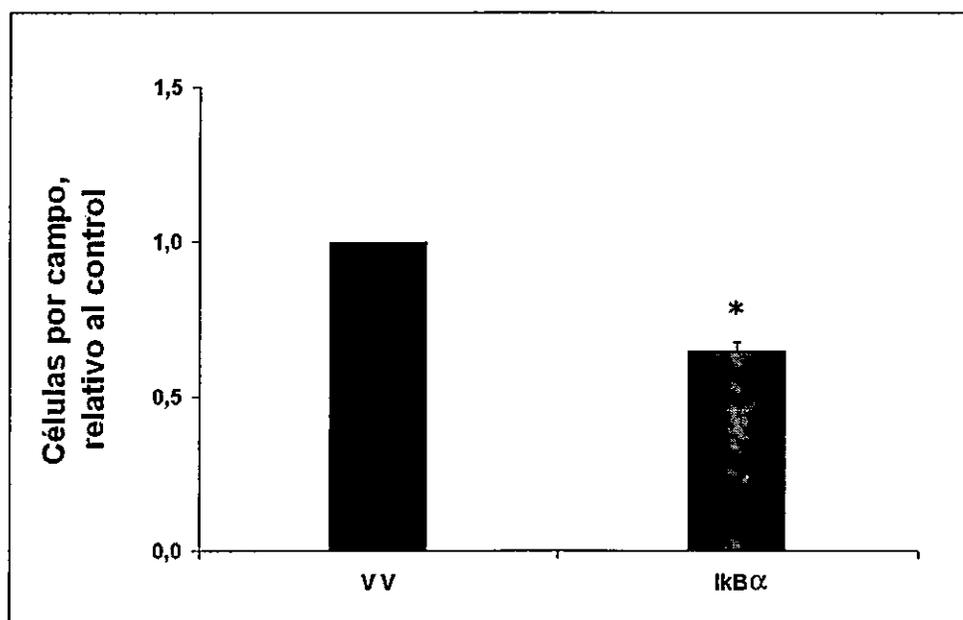
**Figura 16.** RT-PCR para uPA (357 pb) y GPDH (452 pb) como control de carga, los carriles corresponden a células transfectadas con el vector vacío (VV) y células transfectadas con 2,0 y 2,5  $\mu\text{g/mL}$  del plasmidio que codifica para el inhibidor de NF $\kappa$ B ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ).

Como se observa en la figura 16, las células que fueron transfectadas con  $\text{pI}\kappa\text{B}\alpha$ , presentan una menor expresión del mRNA de Uroquinasa lo que sugiere que la actividad transcripcional del promotor de uPA regulada por Rac1, posiblemente depende de la activación de la vía NF $\kappa$ B, a través de una señalización mediada por ROS. Teniendo en cuenta estos resultados, investigamos si la capacidad invasiva de estas células, que como mostramos anteriormente depende de la actividad de Rac, estaría determinada por la activación de la vía de NF $\kappa$ B.

#### D. Evaluación de la capacidad invasiva, en función de la actividad de NF $\kappa$ b.

Para asociar la actividad NF $\kappa$ B con la invasividad de células MCF-7, realizamos un ensayo de invasión en el cual las células fueron previamente transfectadas con el plasmido que codifica para I $\kappa$ B $\alpha$ .

La actividad de NF $\kappa$ B media la capacidad invasiva de células MCF-7.



**Figura 17.** Ensayo de invasión en insertos bicamerales (Transwell) para células controles (VV) y células transfectadas con pI $\kappa$ B $\alpha$  durante 12 horas y dejadas a invadir durante 36 horas. El gráfico muestra el promedio de células invasivas por campo, relativas al control y la barra de error corresponde al error estándar. (\*) Diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ .

En las figuras 16 y 17 se demuestra que el bloqueo de la activación de NF $\kappa$ B provoca una inhibición de la expresión de uPA y del potencial invasor, lo que subraya la importancia de la vía de NF $\kappa$ B en el potencial invasivo de las células MCF-7.

## VII. DISCUSIÓN

Los procesos de malignización de tumores epiteliales suponen la pérdida de algunas propiedades que definen la morfo-funcionalidad del epitelio y la adquisición de un set de funciones que permiten el desarrollo de una conducta migratoria (Lozano, Betson y Col. 2003). De este modo, las células, junto con perder su morfología cuboidal, su polaridad y la fuerte adhesión célula-célula adquieren otras propiedades que inducen un aumento de la motilidad, elemento clave en la adquisición de características metastásicas (Pawlak y Helfman 2001). Además de la adquisición de propiedades móviles, y producto de la transformación, la célula epitelial comienza también a producir un conjunto de enzimas proteolíticas cuya actividad se suma a las propiedades migratorias intrínsecas con lo que se constituye el fenotipo metastásico (Santibanez, Guerrero y Col. 2002).

Sobre la base de estas consideraciones, en el presente trabajo establecimos un modelo de estudio utilizando las células MCF-7, que constituyen una línea celular de características epiteliales, débilmente invasiva. En estas células, intentamos evaluar el papel de la GTPasa Rac, que juega un papel central en la motilidad celular (Keely, Westwick y Col. 1997; Kaibuchi, Kuroda y Col. 1999) y ha sido involucrada en la generación de ROS dado su participación en la activación de la NADPH oxidasa (Bokoch y Diebold 2002; Ray y Shah 2005; Hordijk 2006), en la adquisición de características propias de un fenotipo maligno.

Para ello, realizamos dos tipos de experimentos: por una parte analizamos la expresión y funcionalidad de E-Cadherina y su relación con la invasividad en clones estables de

células MCF-7 que expresaban la forma dominante negativa de Rac (RacN17) y por otro, sobre-expresamos en forma transitoria en las mismas células tanto la versión activa (RacV12) como la dominante negativa de Rac1 para analizar un conjunto de propiedades funcionales que definen la adquisición de propiedades malignas asociadas a la capacidad de estas células de generar ROS intracelulares.

#### **Estudios en clones estables RacN17.**

Respecto del primer grupo de resultados, pudimos observar que dos clones que sobre-expresan en forma estable RacN17, presentaban una disminución en la expresión de Cadherina-E que se manifiesta marcadamente en las uniones célula-célula (Fig. 2a). Este hallazgo está de acuerdo con la propuesta de Takaishi que asocia la actividad de Rac con una mayor expresión de cad-E (Takaishi, Sasaki y Col. 1997) y adicionalmente con estudios recientes (Noren, Niessen y Col. 2001; Noritake, Watanabe y Col. 2005) en que se establece que Rac1 ejerce a través de su efector IQGAP1, un papel central en la regulación de los procesos de migración y ensamblaje celular por medio de cadherina-E. En dicho trabajo, la forma activa de Rac1 provoca un incremento en la localización de cadherina-E y una acumulación de actina, permitiendo la formación de uniones célula-célula, evento que es inhibido con la sobre-expresión del dominante negativo de Rac1.

El hallazgo que en los clones DN se observe una mayor expresión de Snail y MMP-1 lo interpretamos como el hecho que la actividad de Rac está afectando un sistema de regulación reconocido como el mecanismo predominante de control de la expresión de cadherina-E (Cano, Perez-Moreno y Col. 2000; Nieto 2002). Por otra parte, la disminución en la expresión de cadherina-E se correlaciona directamente con la

capacidad de agregación de la célula lo que refleja el nivel de funcionalidad que alcanza la expresión disminuida de esta proteína. Interesantemente, la expresión disminuida de cadherina-E no trajo consigo un aumento en la capacidad invasiva de las células como podría esperarse si consideramos que la unión célula-célula constituye el principal obstáculo para la migración (Huber, Kraut y Col. 2005) (Figura 4). El hecho que hayamos encontrado una menor capacidad invasiva en las células DN sugiere muy enfáticamente que la actividad de Rac controla corriente abajo otras funciones celulares responsables de la migración que no dependen de la asociación intercelular. En ese sentido, cuando estudiamos la expresión del mRNA que codifica para uPA, serin proteasa de reconocida participación en el fenómeno invasivo tumoral (Reuning, Magdolen y Col. 1998), identificamos un patrón de respuesta perfectamente coincidente con el referido a la invasión (Figura 5) lo que ratifica que otras funciones celulares que definen la capacidad invasiva celular son objeto de control por Rac y presentan mecanismos de regulación independientes de la agregación celular.

#### **Estudios en células que expresan en forma transitoria RacN17 y RacV12.**

Con el propósito de asociar de un modo más global las funciones celulares que promueven la migración y la actividad de Rac1, y como parte del segundo grupo de experimentos que constituyen este trabajo, sobre-expresamos transitoriamente las versiones DN (N17) y permanentemente activa de Rac (V12) en las células MCF-7.

Como era de esperarse, tanto la capacidad invasiva (Figura-6) como la actividad del promotor de uPA (Figura 7) resultaron ser directamente proporcionales con los niveles de actividad de Rac, siendo menores en las células RacN17 y mayores en las RacV12. En la búsqueda de mecanismos que den cuenta de esta modulación de la capacidad

invasiva por Rac, determinamos el nivel de producción de ROS intracelulares y encontramos un patrón en el estado redox intracelular que imita casi perfectamente los dos hallazgos anteriores (Figura 8). Resultados mostrados en las figuras siguientes permitieron confirmar que el tenor oxidativo de la célula es capaz de modular efectivamente la capacidad invasiva (Figuras 9, 10 y 11).

Considerando entonces que Rac1, formando parte de la estructura de la NOX, puede ser parte de la maquinaria intracelular que produce ROS, nos preguntamos que proporción de la producción endógena de ROS es responsabilidad del sistema NOX, y por tanto, de la actividad de Rac y que consecuencia tiene este fenómeno en la adquisición de propiedades invasivas asociadas al fenotipo maligno.

En este sentido, los resultados de la figura 12 y 13 muestran respectivamente que los niveles intracelulares de ROS y la capacidad invasiva -tanto basal como la resultante de la sobre-expresión de la versión permanentemente activa de Rac- son sensibles (cerca de un 60%) a DPI, inhibidor específico de NOX, lo que sugiere fuertemente que tanto en la producción de ROS como en la capacidad invasiva de estas células participa de manera importante la actividad NOX.

En la búsqueda de una ruta de señalización modulada por ROS que de cuenta de los cambios funcionales asociados a la motilidad celular regulada por Rac, identificamos la participación de la vía de  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , factor de transcripción reconocidamente asociado a la modulación del estado redox intracelular (Gloire, Legrand-Poels y Col. 2006) y que adicionalmente tiene una participación en la regulación transcripcional de uPA (Das, Mahabeleshwar y Col. 2003; Mahabeleshwar y Kundu 2003). Nuestros resultados

muestran que la actividad de Rac es directamente proporcional al encendido de la vía de NF $\kappa$ B y que esta modulación también depende de los niveles intracelulares de ROS (figuras 14 y 15). Del mismo modo, también identificamos que la actividad NF $\kappa$ B regula la expresión transcripcional de uPA y la adquisición de propiedades invasivas. Los resultados de esta sección nos permiten señalar que, corriente debajo de Rac, la actividad de NF $\kappa$ B juega rol central en la modulación de las propiedades invasivas (Figuras 16, 17).

Tomando en consideración los resultados obtenidos en ambos tipos de experimentos realizados en el presente trabajo podemos sugerir, a modo de discusión final, los siguientes aspectos:

1. En primer lugar identificamos la existencia de una disociación funcional entre la estabilización de las uniones célula-célula y la adquisición de propiedades invasivas dependientes de ROS en clones que expresan la versión DN de Rac. El hecho que las células pierdan la capacidad de agregación, debido a una disminución en la expresión de cadherina-E, pareciera no ser suficiente estímulo para que para las células alcancen un potencial motogénico. Este hecho puede ser entendido como que para la adquisición de movilidad la célula requiere de la orquestación de varios fenómenos simultáneos, donde la GTPasa Rac, puede estar cumpliendo múltiples funciones en las que el estado redox celular y la vía de NF $\kappa$ B juegan también un rol central.

2. En segundo lugar, podemos deducir de nuestros resultados que la producción endógena de ROS, resultante de la actividad de Rac, es un elemento determinante en el proceso de adquisición del fenotipo maligno. Si bien la participación de Rac en la producción de ROS, derivados de la actividad de la NOX, ha sido ampliamente reportada en células fagocíticas, la acción señalizadora del balance redox en células no fagocíticas es, no sólo más reciente, sino también menos entendida. La importancia que tienen los ROS en la adquisición de propiedades propias del fenotipo invasivo, radicaría en la multiplicidad de blancos potenciales y la diversidad de mecanismos que un cambio en el tono redox puede desencadenar. Este hecho convierte la producción de ROS en un punto de interés en el estudio de posibles terapias contra el cáncer. Ciertamente, la NOX no es la única fuente productora de ROS, y es un hecho conocido que la célula puede estar expuesta al estímulo de ROS externos, no obstante, los resultados del presente trabajo indican que NOX es, efectivamente, responsable mayoritaria de la producción de ROS que estimula la invasividad dado que la inhibición con DPI, provoca la pérdida de la invasividad alcanzada con la forma activa de Rac.
3. Los resultados presentados en esta Tesis permiten establecer una directa correlación entre los niveles de producción endógena de ROS y la invasividad. Ello no significa necesariamente que las líneas celulares que expresen un mayor nivel de invasividad expresen un mayor potencial productor de ROS. Datos no mostrados en esta tesis han mostrado que una línea celular invasiva y gran productora de uPA como la MDA-MB 231, presenta niveles de ROS basales significativamente inferiores a los de la línea MCF-7, claramente menos

invasiva. Estos datos podrían sugerir que por un lado, las ROS pueden jugar un papel diferente dependiendo del status invasivo basal de las células y por otro, que la mantención del estado maligno supone la puesta en marcha de una variedad de procesos (uno de los cuales es la producción de ROS) y cuya complementariedad determina la perpetuación del fenotipo maligno.

4. Finalmente, los datos presentados en esta tesis, indican que en células MCF-7, la modificación del balance REDOX, inducida por la actividad de Rac, es uno de los componentes principales de la modulación río abajo de la actividad del sistema del  $\text{NF}\kappa\text{B}$ . Estos resultados establecen un nuevo panorama para analizar la asociación funcional entre las GTPases de la familia Rho y la invasividad celular, ampliando nuestra visión con respecto al papel del equilibrio oxidativo en funciones celulares, y proporcionando por una parte nuevos blancos posibles para la acción de agentes terapéuticos, que pueden ser desarrollados bajo esta mirada, y por otra un potencial papel protector para los antioxidantes naturales y sintéticos.

#### **PERSPECTIVA BIOTECNOLÓGICA.**

La adquisición de propiedades invasivas constituye el evento decisivo en el desarrollo de metástasis en el proceso canceroso. En este fenómeno, la re-estructuración del citoesqueleto de Actina es un requerimiento esencial pues otorga a la célula características migratorias. En este trabajo de tesis hemos descrito que la sobre-expresión de la forma activa de la proteína Rac1 promueve la adquisición de propiedades que se configuran como características de un fenotipo maligno, a través de un proceso en el cual se ven involucrados los niveles intracelulares de ROS y la

activación de vías transcripcionales que implican un aumento en los niveles de expresión de algunos genes propios de una célula tumoral y que se asocian fuertemente al aumento en la capacidad invasiva. Estos datos permiten sugerir que el proceso iniciado por la activación de Rac y su participación en el complejo NOX, cumple con algunos de los requisitos necesarios para convertirse en un blanco terapéutico potencial para tratar tumores invasivos.

### VIII. CONCLUSIONES.

Esta tesis muestra evidencias sobre algunos aspectos de la adquisición y mantención del fenotipo maligno, en los cuales existiría un importante rol regulador por parte de la GTPasa Rac, en células epiteliales mamarias humanas.

- A. La sobre-expresión de la forma dominante negativa de Rac1 (RacN17), en células epiteliales mamarias MCF-7, disminuye la expresión de Cadherina-E, posiblemente como resultado de una desestabilización de los anclajes Cadherina-Catenina, en los cuales Rac-GTP tiene un rol importante. Asociado a esto se observa un aumento en la expresión de Snail.
- B. Aun existiendo una pérdida de las uniones célula-célula debido a la disminución de las cadherinas, estas células no muestran una mayor capacidad migratoria. Posiblemente debido a la disminuida expresión de Uroquinasa.
- C. En células transfectadas en forma transitoria con plasmidios que codifican para la forma DN y activa de Rac1, identificamos que la actividad de Rac

modula la capacidad invasiva de células epiteliales mamarias y ésta se correlaciona con un aumento en la actividad del promotor de uPA.

D. La actividad de Rac1 también modula la capacidad invasiva de células epiteliales mamarias a través del control de los niveles de producción de ROS los cuales son sensibles a la acción de agentes como NAC y DPI.

E. La actividad de Rac1, es capaz de modular la actividad de la vía de NF $\kappa$ B, la cual está directamente vinculada con el estado redox intracelular y determina fuertemente los niveles de expresión de uPA.

Estos resultados en su conjunto nos permiten señalar que existe una estrecha relación entre la actividad de Rac y la producción de ROS provenientes del complejo NOX y la adquisición de propiedades invasivas a través de un proceso que involucra la activación de la vía de NF $\kappa$ B y la producción de uPA.

**IX. BIBLIOGRAFIA**

1. Andreasen, P. A., R. Egelund, et al. (2000). "The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis." *Cell Mol Life Sci* 57(1): 25-40.
2. Bae, Y. S., S. W. Kang, et al. (1997). "Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* 272(1): 217-21.
3. Baldwin, A. S. (2001). "Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB." *J Clin Invest* 107(3): 241-6.
4. Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." *Annu Rev Immunol* 14: 649-83.
5. Banfi, B., G. Molnar, et al. (2001). "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes." *J Biol Chem* 276(40): 37594-601.
6. Bargou, R. C., C. Leng, et al. (1996). "High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells." *Blood* 87(10): 4340-7.
7. Barinaga, M. (1996). "Life-death balance within the cell." *Science* 274(5288): 724.
8. Batlle, E., E. Sancho, et al. (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." *Nat Cell Biol* 2(2): 84-9.
9. Batsche, E., C. Muchardt, et al. (1998). "RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2." *Mol Cell Biol* 18(7): 3647-58.
10. Blasi, F. and P. Carmeliet (2002). "uPAR: a versatile signalling orchestrator." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12): 932-43.
11. Bokoch, G. M. and B. A. Diebold (2002). "Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase." *Blood* 100(8): 2692-6.
12. Boveris, A., N. Oshino, et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." *Biochem J* 128(3): 617-30.
13. Boyer, B., A. M. Valles, et al. (2000). "Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions." *Biochem Pharmacol* 60(8): 1091-9.
14. Caceres, M., J. Guerrero, et al. (2005). "Overexpression of RhoA-GTP induces activation of the Epidermal Growth Factor Receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells." *Exp Cell Res* 309(1): 229-38.

15. Cano, A., M. A. Perez-Moreno, et al. (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." *Nat Cell Biol* 2(2): 76-83.
16. Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* 420(6917): 860-7.
17. Das, R., G. H. Mahabeleshwar, et al. (2003). "Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells." *J Biol Chem* 278(31): 28593-606.
18. De Craene, B., F. van Roy, et al. (2005). "Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors." *Cell Signal* 17(5): 535-47.
19. Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." *Nature* 420(6916): 629-35.
20. Fan, C. M. and T. Maniatis (1991). "Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway." *Nature* 354(6352): 395-8.
21. Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.
22. Gloire, G., S. Legrand-Poels, et al. (2006). "NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later." *Biochem Pharmacol* 72(11): 1493-505.
23. Guerrero, J., J. F. Santibanez, et al. (2004). "EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases." *Exp Cell Res* 292(1): 201-8.
24. Gumbiner, B. M. (2000). "Regulation of cadherin adhesive activity." *J Cell Biol* 148(3): 399-404.
25. Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science* 279(5350): 509-14.
26. Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" *Br J Pharmacol* 142(2): 231-55.
27. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.

28. Hay, E. D. and A. Zuk (1995). "Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced." *Am J Kidney Dis* 26(4): 678-90.
29. Hordijk, P. L. (2006). "Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins." *Circ Res* 98(4): 453-62.
30. Huang, S., J. B. Robinson, et al. (2000). "Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8." *Cancer Res* 60(19): 5334-9.
31. Huber, M. A., N. Azoitei, et al. (2004). "NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression." *J Clin Invest* 114(4): 569-81.
32. Huber, M. A., N. Kraut, et al. (2005). "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression." *Curr Opin Cell Biol* 17(5): 548-58.
33. Iwanaga, M., K. Mori, et al. (1998). "Nuclear factor kappa B dependent induction of gamma glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation in T98G human glioblastoma cells." *Free Radic Biol Med* 24(7-8): 1256-68.
34. Kaibuchi, K., S. Kuroda, et al. (1999). "Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells." *Annu Rev Biochem* 68: 459-86.
35. Keely, P. J., J. K. Westwick, et al. (1997). "Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K." *Nature* 390(6660): 632-6.
36. Kordes, U., D. Krappmann, et al. (2000). "Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells." *Leukemia* 14(3): 399-402.
37. Kruger, A., R. Soeltl, et al. (2000). "Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87)." *Cancer-Gene-Ther* 7(2): 292-9.
38. Lambeth, J. D., G. Cheng, et al. (2000). "Novel homologs of gp91phox." *Trends Biochem Sci* 25(10): 459-61.
39. Lind, D. S., S. N. Hochwald, et al. (2001). "Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer." *Surgery* 130(2): 363-9.

40. Liu, J. F., M. Crepin, et al. (2002). "FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 293(4): 1174-82.
41. Los, M., H. Schenk, et al. (1995). "IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase." *Embo J* 14(15): 3731-40.
42. Lozano, E., M. Betson, et al. (2003). "Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion." *Bioessays* 25(5): 452-63.
43. Mahabeleshwar, G. H. and G. C. Kundu (2003). "Tyrosine kinase p56lck regulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha following hypoxia/reoxygenation." *J Biol Chem* 278(52): 52598-612.
44. Mercurio, F., J. A. DiDonato, et al. (1993). "p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction." *Genes Dev* 7(4): 705-18.
45. Meyskens, F. L., Jr., J. A. Buckmeier, et al. (1999). "Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanomacells and the effect of oxidative stress." *Clin Cancer Res* 5(5): 1197-202.
46. Montaner, S., R. Perona, et al. (1998). "Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases." *J Biol Chem* 273(21): 12779-85.
47. Mori, K., M. Shibanuma, et al. (2004). "Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells." *Cancer Res* 64(20): 7464-72.
48. Nakshatri, H., P. Bhat-Nakshatri, et al. (1997). "Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth." *Mol Cell Biol* 17(7): 3629-39.
49. Nguyen, D. H., I. M. Hussaini, et al. (1998). "Binding of urokinase-type plasminogen activator to its receptor in MCF-7 cells activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 which is required for increased cellular motility." *J Biol Chem* 273(14): 8502-7.
50. Nieto, M. A. (2002). "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3): 155-66.
51. Noren, N. K., C. M. Niessen, et al. (2001). "Cadherin engagement regulates Rho family GTPases." *J Biol Chem* 276(36): 33305-8.

52. Noritake, J., T. Watanabe, et al. (2005). "IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration." *J Cell Sci* 118(Pt 10): 2085-92.
53. Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* 18(49): 6853-66.
54. Palayoor, S. T., M. Y. Youmell, et al. (1999). "Constitutive activation of I kappa B kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen." *Oncogene* 18(51): 7389-94.
55. Pawlak, G. and D. M. Helfman (2001). "Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis." *Curr Opin Genet Dev* 11(1): 41-7.
56. Peinado, H., F. Marin, et al. (2004). "Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2827-39.
57. Perez-Moreno, M. A., A. Locascio, et al. (2001). "A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions." *J Biol Chem* 276(29): 27424-31.
58. Perona, R., S. Montaner, et al. (1997). "Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins." *Genes Dev* 11(4): 463-75.
59. Rabbani, S. A. and A. P. Mazar (2001). "The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis." *Surg Oncol Clin N Am* 10(2): 393-415, x.
60. Radisky, D. C., D. D. Levy, et al. (2005). "Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability." *Nature* 436(7047): 123-7.
61. Ray, R. and A. M. Shah (2005). "NADPH oxidase and endothelial cell function." *Clin Sci (Lond)* 109(3): 217-26.
62. Rayet, B. and C. Gelinias (1999). "Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer." *Oncogene* 18(49): 6938-47.
63. Reuning, U., V. Magdolen, et al. (1998). "Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review)." *Int J Oncol* 13(5): 893-906.
64. Rice, N. R., M. L. MacKichan, et al. (1992). "The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions." *Cell* 71(2): 243-53.
65. Sahai, E. and C. J. Marshall (2002). "RHO-GTPases and cancer." *Nat Rev Cancer* 2(2): 133-42.
66. Santibanez, J. F., P. Frontelo, et al. (1999). "Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor beta1-induced migratory and

- invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes." *J Cell Biochem* 74(1): 61-73.
67. Santibanez, J. F., J. Guerrero, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 296(2): 267-73.
68. Savagner, P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition." *Bioessays* 23(10): 912-23.
69. Self, A. J. and A. Hall (1995). "Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*." *Methods Enzymol* 256: 3-10.
70. Sovak, M. A., R. E. Bellas, et al. (1997). "Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer." *J Clin Invest* 100(12): 2952-60.
71. Sun, S. C. and G. Xiao (2003). "Deregulation of NF-kappaB and its upstream kinases in cancer." *Cancer Metastasis Rev* 22(4): 405-22.
72. Tai, D. I., S. L. Tsai, et al. (2000). "Constitutive activation of nuclear factor kappaB in hepatocellular carcinoma." *Cancer* 89(11): 2274-81.
73. Takaishi, K., T. Sasaki, et al. (1997). "Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells." *J Cell Biol* 139(4): 1047-59.
74. Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-54.
75. Thiery, J. P. and D. Chopin (1999). "Epithelial cell plasticity in development and tumor progression." *Cancer Metastasis Rev* 18(1): 31-42.
76. Wang, C. Y., M. W. Mayo, et al. (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." *Science* 274(5288): 784-7.
77. Werner, E. (2004). "GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling." *J Cell Sci* 117(Pt 2): 143-53.
78. Werner, E. and Z. Werb (2002). "Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases." *J Cell Biol* 158(2): 357-68.
79. Woodhouse, E. C., R. F. Chuaqui, et al. (1997). "General mechanisms of metastasis." *Cancer* 80(8 Suppl): 1529-37.

80. Yang, J. and A. Richmond (2001). "Constitutive I $\kappa$ B kinase activity correlates with nuclear factor- $\kappa$ B activation in human melanoma cells." *Cancer Res* 61(12): 4901-9.
81. Yoshioka, K., S. Nakamori, et al. (1999). "Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells." *Cancer Res* 59(8): 2004-10.