



Título del artículo.

**Explorando las bases celulares y moleculares del cáncer: hacia la identificación de nuevos blancos terapéuticos.**

Título del artículo en idioma Inglés.

**The conception of the warrior within the Mexican worldview.**

Autores.

Miguel Ángel Mendoza Catalán  
Edith Milena Alvarado Cuevas  
Napoleón Navarro Tito  
Brendan Bell  
Eduardo Castañeda Saucedo

Referencia bibliográfica:

MLA

Mendoza Catalán, Miguel Ángel, Edith Milena Alvarado Cuevas, Napoleón Navarro Tito, Brendan Bell y Eduardo Castañeda Saucedo. Explorando las bases celulares y moleculares del cáncer: hacia la identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Tlamati* 8.1, (2017): 5-10. Print.

APA

Mendoza Catalán, M. A., Alvarado Cuevas, E. M., Navarro Tito, N., Bell, B. y Castañeda Saucedo, E. (2017). Explorando las bases celulares y moleculares del cáncer: hacia la identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Tlamati*, 8(1), 5-10.

---

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Junio del 2017

© 2017 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

*TLAMATI*, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



## Explorando las bases celulares y moleculares del cáncer: hacia la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

Miguel Angel Mendoza Catalán<sup>1</sup>  
 Edith Milena Alvarado Cuevas<sup>2</sup>  
 Napoleón Navarro Tito<sup>1</sup>  
 Brendan Bell<sup>2</sup>  
 Eduardo Castañeda Saucedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Av. Lázaro Cárdenas s/n. C.U. Zona Sur. C. P. 39070. Chilpancingo, Guerrero, México. Tel: +(52) 7471-066-864  
<sup>2</sup>Universidad de Sherbrooke. Facultad de Medicina. Quebec, Canadá

\*Autor de correspondencia  
 catalan\_mike@yahoo.com.mx

### Resumen

El cáncer es un grupo de enfermedades de etiología y evolución muy diversa, que hace complicada la tarea de desarrollar estrategias efectivas para el tamizaje, diagnóstico temprano y tratamiento de esta enfermedad. El cáncer es un proceso evolutivo y existen dos procesos celulares muy importantes para su desarrollo, los cuales han sido estudiados por su potencial como blancos terapéuticos: la migración celular y la apoptosis. Inhibir la migración celular evitaría la diseminación de las células tumorales, y la inducción de la apoptosis permitiría matar selectivamente a las células cancerosas. Las proteínas denominadas GTPasas de la familia Rho, son consideradas como potenciales blancos terapéuticos, ya que inhibir su función podría impedir la invasión de las células tumorales, sin embargo, se desconoce si esto podría ser aplicado a cualquier tipo de cáncer. Por otro lado, recientemente se encontró que la proteína TAF6 delta podría matar selectivamente a las células cancerosas, pero se desconoce el mecanismo mediante el cual esta proteína ejerce su efecto. En nuestro grupo de trabajo utilizamos modelos experimentales y técnicas bioquímicas y moleculares para estudiar el papel de las GTPasas Rho y de la proteína TAF6delta. Utilizamos líneas celulares de cáncer de mama para evaluar el papel de las GTPasas Rho en la migración celular, mediante ensayos de migración e invasión in vitro. Por otro lado, utilizamos líneas celulares de diversos tipos de cáncer para inducir experimentalmente la sobre-expresión de TAF6delta y evaluar su efecto sobre la muerte celular y la expresión de genes. Nuestros resultados preliminares muestran que la inhibición de las GTPasas Rho inhibe la migración de células de cáncer de mama poco agresivas, pero no la de células muy agresivas. La sobreexpresión de TAF6delta en líneas celulares de cáncer activa la vía de señalización NOTCH e induce apoptosis.

**Palabras clave:** cáncer, bases celulares, blancos terapéuticos.

### Abstract

Cancer is a group of diseases of very diverse etiology and evolution, which complicates the task of developing effective strategies for screening, early diagnosis and treatment of this disease. Cancer is an evolutionary process and there are two very important cellular processes for its development which have been studied for their potential as therapeutic targets, as follows: cell migration and apoptosis. Inhibiting cell migration would prevent the spread of tumor cells and the induction of apoptosis would selectively kill cancer cells. The proteins called GTPasas of the Rho family

### Como citar el artículo:

Mendoza Catalán, M. A., Alvarado Cuevas, E. M., Navarro Tito, N., Bell, B. y Castañeda Saucedo, E. (2017). Explorando las bases celulares y moleculares del cáncer: hacia la identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Tlamati*, 8(1), 5-10.

are considered as potential therapeutic targets, since inhibiting their function could prevent the invasion of tumor cells, however, it is unknown if this could be applied to any type of cancer. On the other hand, it was found recently that TAF6 delta protein could selectively kill cancer cells, but the mechanism by which this protein exerts its effect is unknown. In our working group we used experimental models and biochemical and molecular techniques to study the role of Rho GTPasas and TAF6delta protein. We use breast cancer cell lines to evaluate the role of Rho GTPasas in cell migration, through in vitro invasion and invasion assays. On the other hand, we use cell lines of various types of cancer to experimentally induce the over-expression of TAF6delta and evaluate its effect on cell death and gene expression. Our preliminary results show that inhibition of Rho GTPasas inhibits the migration of non-aggressive breast cancer cells, but not that of very aggressive cells. Overexpression of TAF6delta in cancer cell lines activates the NOTCH signaling pathway and induces apoptosis.

**Key words:** cancer, cellular bases, therapeutic targets.

## Introducción

El cáncer es un grupo de enfermedades de etiología y evolución muy diversa, que hace complicada la tarea de desarrollar estrategias efectivas para el tamizaje, diagnóstico temprano y tratamiento de esta enfermedad. Además, el cáncer es un proceso evolutivo que se desarrolla a través de etapas bien caracterizadas, que van desde la adquisición de alteraciones genéticas o epigenéticas por las células del organismo, hasta la formación de tumores que invaden tejidos aledaños y en etapas avanzadas, migran a órganos distantes donde establecen un tumor secundario, llevando en la mayoría de los casos a la muerte del paciente. Existen dos procesos celulares muy importantes para el desarrollo, los cuales han sido ampliamente estudiados por su potencial como blancos terapéuticos: la migración celular y la apoptosis. El proceso de migración celular es necesario para que las células del tumor primario puedan desplazarse e invadir tejidos aledaños, llegar a los vasos sanguíneos y posteriormente establecer el tumor secundario (Ilina y Friedl, 2009). Este proceso es regulado de manera importante por un grupo de proteínas denominadas GTPasas Rho, las cuales modulan el reordenamiento del citoesqueleto para permitir la movilidad de las células (Heasman y Ridley, 2008). Estas proteínas son consideradas como potenciales blancos terapéuticos, ya que inhibir su función

inhibe la migración celular en modelos experimentales in vitro e in vivo y podría impedir la invasión de las células tumorales en los pacientes (Fritz y Kaina, 2006; Vega y Ridley, 2008). También se ha mostrado que la sobreexpresión de una de estas proteínas denominada Rac1 está relacionada con la resistencia de células de cáncer de mama en cultivo al tratamiento con un agente quimioterapéutico (Dokmanovic, Hirsch, Shen, y Wu, 2009; Zhao, Wang, Jiang y Yang, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que una isoforma de la proteína TAF6delta, la cual forma parte de la maquinaria basal de transcripción y cuya expresión es inducida en respuesta a estímulos apoptóticos (Bell, Scheer y Tora, 2001), juega un papel importante en la regulación de la apoptosis y la expresión de genes en ausencia o presencia de la proteína p53 (Wilhelm, Pellay, Benecke y Bell, 2008; Wilhelm, E., Kornete, Targat, Vigneault-Edwards, Frontini, Tora, Benecke y Bell, 2010). Al analizar el efecto de TAF6 $\delta$  en diversas líneas celulares cancerosas se encontró que incrementa la muerte celular, sin embargo las bases moleculares para esta inducción de apoptosis por TAF6 $\delta$  son actualmente desconocidas.

El objetivo de este proyecto es evaluar el efecto de la inhibición de las GTPasas Rac1 y RhoA sobre la migración de células de cáncer de mama en cultivo en respuesta

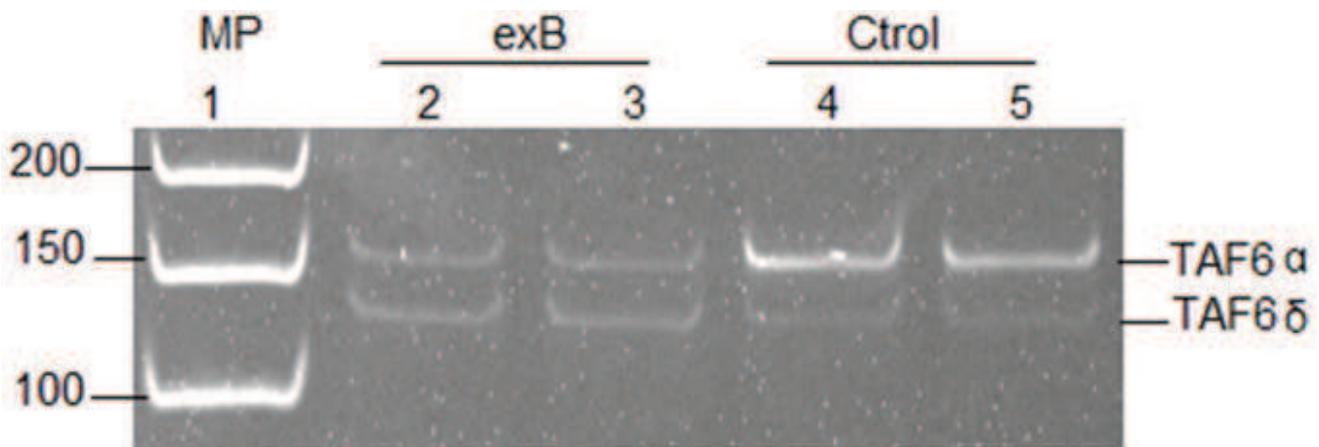


Figura 1. Expresión de TAF6delta en células Hela transfectadas con los oligonucleótidos SSOs. Gel de poliacrilamida al 15% en el que se muestran la sobreexpresión de TAF6delta tras la transfección con los oligos SSOs. Carril 1: marcador de peso 1Kb; carril 2 y 3 sistema SSOs, exB y carriles 4 y 5 SSOs control.

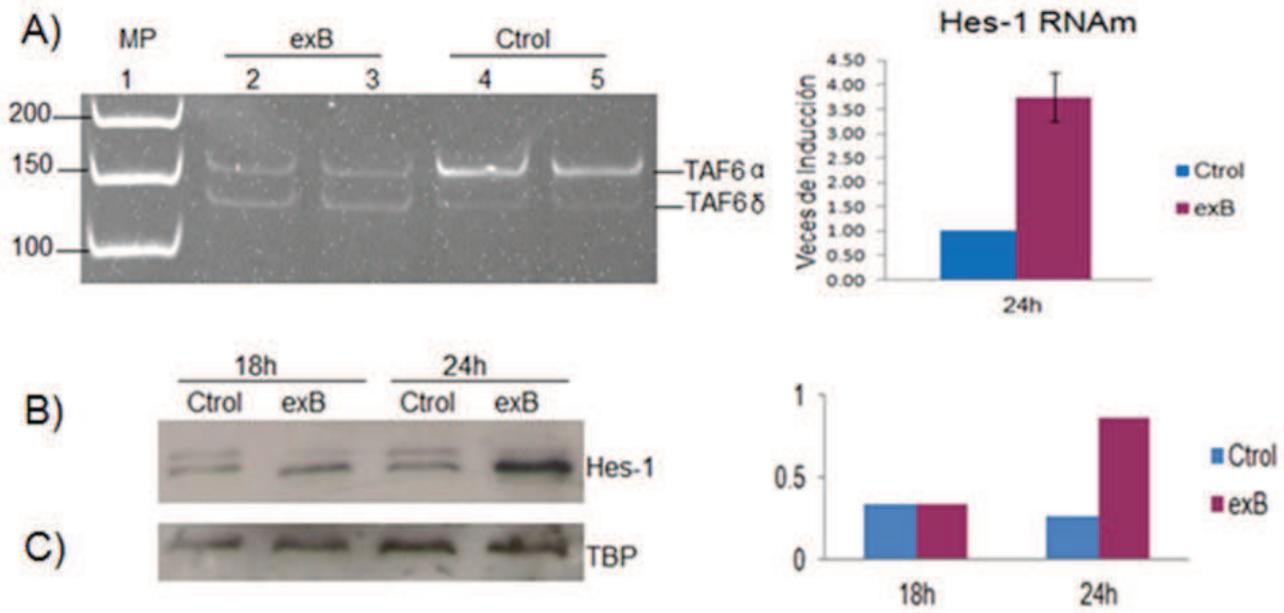


Figura 2. Expresión de Hes-1 en células HeLa tras la sobreexpresión de TAF6delta. (A) Nivel del RNAm mediante RT-PCR en tiempo real de Hes-1, 24h post-transfección del sistema SSOs. Columna 1 y 2: repeticiones por triplicado de cada una. SSOs control (barras azules) y SSOexB (barras vinotinto). (B) Expresión proteica mediante western blot de Hes-1, 18h y 24h post-transfección del sistema SSOs (C) Densitometría del western blot, cuantificada por ImageJ.

a leptina. Y por otro lado, evaluar el efecto de la sobreexpresión de TAF6delta sobre la expresión de Hes1 y ciclina D1.

### Material y Métodos

#### Cultivo de células

Las líneas celulares HeLa (carcinoma cervical), Saos-2 (cáncer de hueso), A549 (cáncer de pulmón) y MCF-7 y MDA-MB-231 (ambas de carcinoma mamario) se cultivaron en monocapa en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium/F12* (Gibco) suplementado al 5% con suero fetal de Bovino a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Sobreexpresión de TAF6delta.

Los cultivos de células HeLa, Saos-2 y A549, a una

confluencia del 50% fueron transfectadas con oligonucleótidos de cambio de splicing (SSOs) los cuales favorecen la síntesis de la isoforma TAF6delta. Los oligonucleótidos utilizados son "SSO T6-3" 5'-CUGUGCGAUCUCUUUGAUGC-3' que flanquea la región 3' del exón 2 alternativo de TAF6 y como control negativo se usó el oligo inespecífico 5' -AUGGCCUCGACGUGCGCGCU-3', y fueron transfectados a una concentración final de 100nM con lipofectamina 2000 (Invitrogen).

#### Western blot (WB)

Los niveles de las proteínas blanco de TAF6delta (ciclina 1, HES1, Notch 1 y Notch 2) fueron analizados

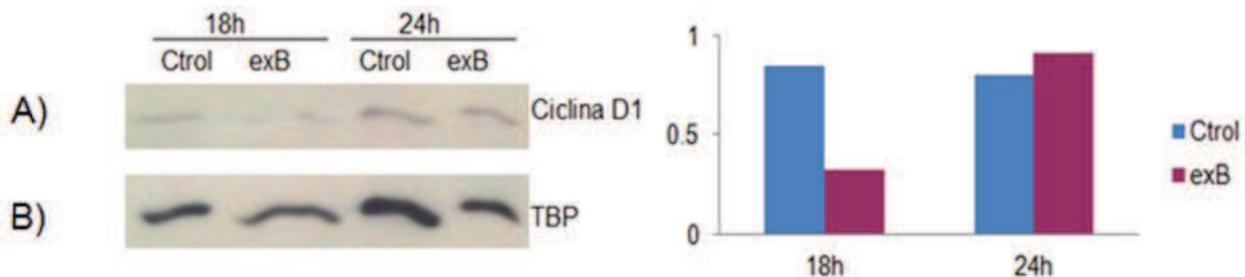


Figura 3. Expresión de Ciclina D1 en células HeLa tras la sobreexpresión de TAF6delta. (A) Expresión proteica mediante western blot a 18h y 24h post-transfección del sistema SSOs (B) Cuantificación por ImageJ.

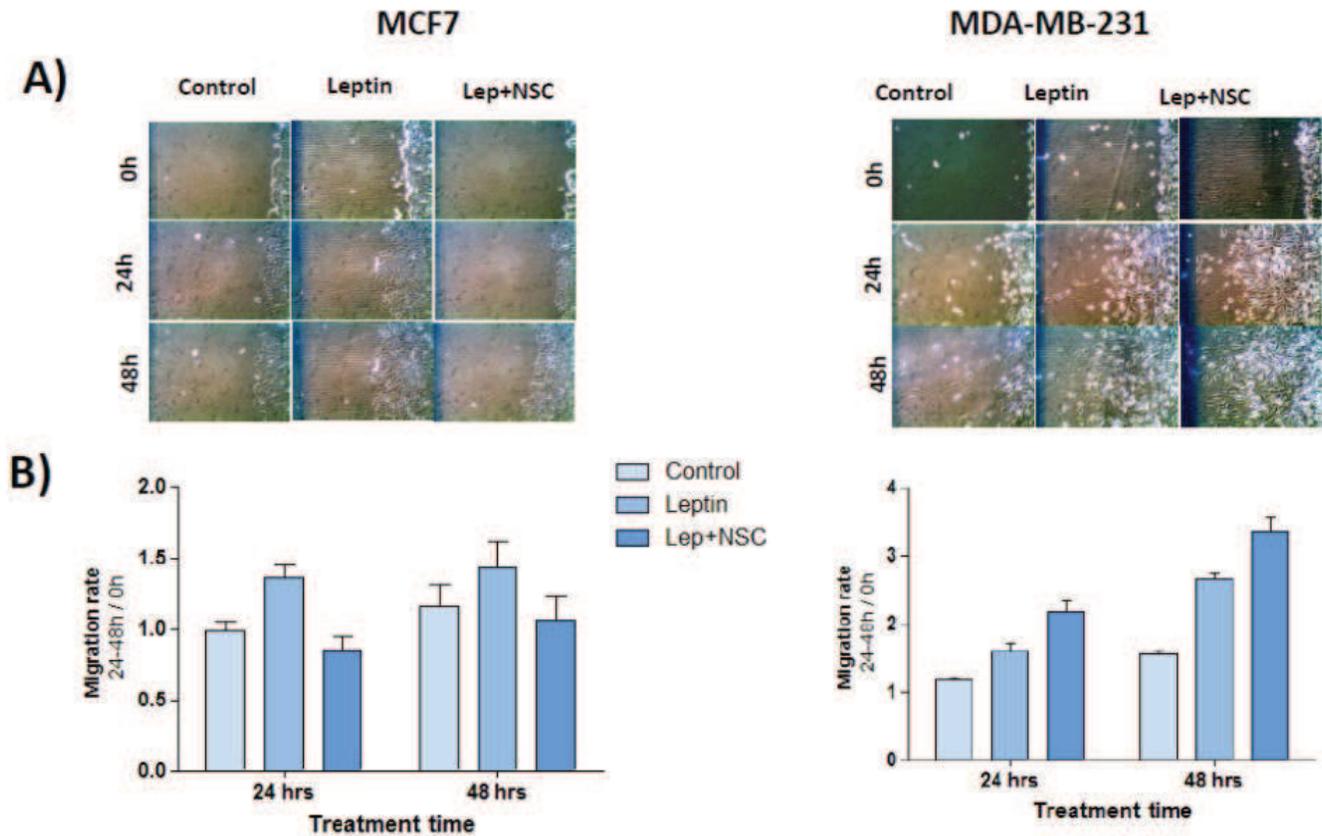


Figura 4. Efecto de la inhibición de Rac1 en la migración de células MCF7 y MDA-MB231. A) Ensayo de migración en placa. B) Promedio de la migración en los ensayos de migración en placa. Control: células tratadas con vehículo. Lep: leptina, 50ng/ml para MDA-MB231 y 400ng/ml para MCF7 cells. NSC: inhibidor químico de Rac1 NSC23766, 25uM.

por Western blot. Se obtuvieron las proteínas totales de las células transfectadas con los oligonucleótidos SSOs, fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y las membranas incubadas con los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de interés y revelados con el kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Las membranas serán expuestas a placas radiográficas para visualizar el resultado.

#### RT-PCR

Los niveles del RNAm de los genes blanco de TAF6delta (ciclina D1 y HES1) se analizaron por RT-PCR. El RNAm de las células transfectadas con los oligonucleótidos SSOs se mediante el método de Trizol (Invitrogen). Se sintetizó el cDNA utilizando la transcriptasa reversa AMV-RT (Roche). La amplificación de los fragmentos de interés se realizó por PCR utilizando 95°C, 3 min; 25 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 45 seg, 68°C por 50 sec; extensión final a 68°C por 5 min con los siguientes oligonucleótidos para TAF6; 5'-ATGGGCATCGCCAGATTCAGG-3' y reverse 5'-AAGGCGTAGTCAATGTCACTGG-3'(Wilhelm et al., 2008).

#### Ensayos de migración en placa.

Las células MCF-7 o MDA-MB-231 se sembraron en placas de 6 pozos (Sarstedt) hasta alcanzar 100% de confluencia. Se realizó una incisión longitudinal en la monocapa con una punta de plástico, se realizó un lavado para eliminar las células despegadas y se incubó por 24h o 48h en presencia o no de leptina. Las células fueron observadas y fotografiadas cada 4 horas bajo un microscopio invertido. Las imágenes digitales se utilizaron para calcular la distancia recorrida por las células en los diferentes periodos de tiempo.

#### Ensayos de migración en cámara de Boyden.

Las células se sembraron en el compartimento superior de cámaras de Boyden (BD Biosciences), sobre un filtro de 8µm recubierto con fibronectina, en medio sin suero. En el compartimento inferior de la cámara se agregará medio con suero. Las células serán tratadas con o sin leptina, permitiendo la migración de las células a través del filtro por 12-48 horas. Las células que migraron hacia la parte inferior del filtro serán contadas bajo un microscopio de luz visible.

*Ensayos de invasión en Matrigel.*

Para los ensayos de invasión, se procedió como en el apartado anterior, pero los filtros fueron recubiertos con una matriz protéica (Matrigel, BD Biosciences) para evaluar la capacidad de las células de invadir esta matriz.

**Resultados***Sobreexpresión de TAF6delta en células Hela.*

Las células Hela fueron transfectadas con los oligonucleótidos SSOs, y como se muestra en la Figura 1, los niveles del RNAm de TAF6delta incrementan en las células transfectadas, demostrando la eficiencia del sistema de estudio.

*Efecto de la sobreexpresión de TAF6delta sobre los niveles del RNAm y de la proteína de la Hes1 y ciclina D1.*

Estudios preliminares de microarreglos sugieren que la sobreexpresión de TAF6delta da como resultado el incremento en los niveles del RNAm de la ciclina D1 y de Hes1. Para corroborar estos resultados, los niveles del mRNA y proteína de Hes1 fueron analizados en las células Hela tras la inducción de la expresión de TAF6delta, mediante RT-PCR y Western blot respectivamente. Encontramos que la sobreexpresión de TAF6delta induce un incremento de los niveles de Hes1, tanto a nivel de mensajero como de proteína (véase figura 2).

Por otro lado, medimos los niveles de la proteína ciclina D1 en las células que sobreexpresan TAF6delta, encontrando que a las 18 horas hay una disminución en los niveles de ciclina D1 y un ligero incremento de la proteína a las 24 horas (véase figura 3)

*Efecto de la inhibición de Rac1 y de RhoA en la migración de células MCF7 y MDA-MB-231.*

En ensayos preliminares encontramos que la leptina, una hormona producida por los adipocitos, induce la migración de las células MCF-7 y MDA-MB-231. Utilizando ensayos de migración en placa, encontramos que la inhibición química de Rac1 reduce la migración de las células MCF-7 en respuesta a leptina, sin embargo, en las células MDA-MB-231, la inhibición de Rac1 resulta en un incremento en la migración inducida por leptina (véase figura 4).

Por otro lado, encontramos que la inhibición química de RhoA reduce la migración tanto de las células MCF-7 como de las MDA-MB-231 (véase figura 5). Para validar estos resultados, utilizamos ensayos de migración en cámara de Boyden, y encontramos que al igual que en los ensayos de migración en placa, la inhibición química de Rac1 reduce la migración inducida por leptina en células MCF-7 y aumenta la migración en células MDA-MB-231, mientras que la inhibición química de RhoA reduce la migración en ambas líneas celulares (véase figura 6A).

*Efecto de la inhibición de Rac1 y de RhoA en la invasión de células MCF7 y MDA-MB-231.*

Para determinar el efecto de la inhibición de las proteínas Rac1 y RhoA en la invasividad de las células MCF-7 y MDA-MB-231, utilizamos ensayos de invasión en Matrigel. Encontramos que al igual que en los ensayos de migra-

ción, la inhibición química de Rac1 reduce la invasión inducida por leptina en células MCF-7 y la aumenta en células MDA-MB-231, mientras que la inhibición química de RhoA reduce la invasión en ambas líneas celulares (véase figura 6B)

**Discusión y Conclusión**

Nuestros resultados muestran que TAF6delta regula la expresión de Hes1, un gen blanco de la vía NOTCH. La vía NOTCH es una vía que está implicada en la diferenciación celular y desarrollo embrionario, sin embargo también se ha identificado como una vía que se encuentra hiperactiva en cánceres humanos. Nuestros resultados sugieren que la proteína TAF6delta podría servir como vínculo entre la vía NOTCH y la maquinaria basal de transcripción, y que esto podría estar implicado en la regulación de la apoptosis de células cancerosas. Por otro lado, demostramos que la inhibición de Rac1 impide la migración de células de cáncer de mama poco agresivas, pero no la de las células más agresivas. Mientras que la inhibición de RhoA reduce la migración de ambos tipos celulares. Resultados de otros grupos de trabajo sugieren que Rac1 y RhoA tienen efecto antagónico en la migración celular. Además, existen evidencias que las vías intracelulares que llevan a la activación de Rac1 y de RhoA pueden estar alteradas de manera diferencial en diferentes etapas de cáncer. Nuestros resultados sugieren que estas proteínas pueden ser blanco terapéutico, sin embargo su uso dependería del estado de progresión de los tumores.

**Agradecimientos**

Agradecemos el apoyo técnico de Ángel Salmerón Hernández, Ramón Antaño Arias, Javier Ramírez Ricardo, José Armando Salvador Chavelas, Itzel Carranza Mendoza, Abdiel Galeana Guzmán y Emmanuelle Wheelman para la realización de los experimentos. Este trabajo ha sido posible gracias al financiamiento otorgado al Dr. Eduardo Castañeda Saucedo por el CONACYT mediante el programa de ciencia básica (proyecto clave 100888) y el financiamiento interno de la Universidad Autónoma de Guerrero.

**Referencias**

- Bell, B., Scheer, E. y Tora, L. (2001). Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function. *Molecular Cell*, 8(3), 591-600.
- Dokmanovic, M., Hirsch, D. S., Shen, Y. y Wu, W. J. (2009). Rac1 contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells: Rac1 as a potential therapeutic target for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(6), 1557-69.
- Fritz, G. y Kaina, B. (2006). Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets*, 6(1), 1-14.
- Heasman, S. J. y Ridley A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(9), 690-701.
- Irina, O. y Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(18), 3203-3208.

- Vega, F. M. y Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Letters*, 582(14), 2093-2101.
- Wilhelm, E., Pellay, F. X., Benecke, A. y Bell, B. (2008). TAF6delta controls apoptosis and gene expression in the absence of p53. *PLoS One*, 3(7), e2721.
- Wilhelm, E., Kornete, M., Targat, B., Vigneault-Edwards, J., Frontini, M., Tora, L., Benecke, A. y Bell, B. (2010). TAF6delta orchestrates an apoptotic transcriptome profile and interacts functionally with p53. *BMC Molecular Biology*, 11, 10.
- Zhao, Y., Wang, Z. Jiang, Y. y Yang, C. (2011). Inactivation of Rac1 reduces Trastuzumab resistance in PTEN deficient and insulin-like growth factor I receptor over-expressing human breast cancer SKBR3 cells. *Cancer Letters*, 313(1), 54-63. -101.