

RHO GTPASAS COMO BLANCOS TERAPEUTICOS RELEVANTES EN CANCER Y OTRAS ENFERMEDADES HUMANAS

PABLO LORENZANO MENNA¹, GEORGINA A. CARDAMA¹, MARIA J. COMIN²,
DANIEL F. ALONSO¹, DANIEL E. GOMEZ¹

¹Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes,

²Centro Investigación y Desarrollo en Química, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Buenos Aires

Resumen Las Rho GTPasas son una familia de proteínas clave en la transmisión de señales provenientes del exterior celular hacia efectores intracelulares tanto citoplasmáticos como nucleares. En los últimos años ha habido un desarrollo vertiginoso de múltiples herramientas genéticas y farmacológicas, lo que ha permitido establecer de manera mucho más precisa las funciones específicas de estas proteínas. El objetivo de la presente revisión es hacer foco en las múltiples funciones celulares reguladas por las Rho GTPasas, describiendo en detalle el mecanismo molecular involucrado. Se discute además la participación de estas proteínas en diversas enfermedades humanas haciendo énfasis en su vinculación con el cáncer. Por último, se hace una actualización detallada sobre las estrategias terapéuticas en experimentación que tienen a las Rho GTPasas como blancos moleculares.

Palabras clave: señalización celular, citoesqueleto, migración celular, enfermedades neurodegenerativas, cáncer

Abstract *Rho GTPases as therapeutic targets in cancer and other human diseases.* Rho GTPases are a key protein family controlling the transduction of external signals to cytoplasmatic and nuclear effectors. In the last few years, the development of genetic and pharmacological tools has allowed a more precise definition of the specific roles of Rho GTPases. The aim of this review is to describe the cellular functions regulated by these proteins with focus on the molecular mechanism involved. We also address the role of Rho GTPases in the development of different human diseases such as cancer. Finally, we describe different experimental therapeutic strategies with Rho GTPases as molecular targets.

Key words: cell signaling, cytoskeleton, cell migration, neurodegenerative diseases, cancer

Los mecanismos de señalización celular son determinantes fundamentales en la coordinación y las funciones de los distintos tipos celulares. Las células reciben información del ambiente, ya sea mediante interacciones célula-célula y célula-matriz u otros estímulos del microambiente tisular, como citoquinas y factores de crecimiento. Diferentes vías de señalización median respuestas celulares, incluyendo cambios en la conformación de proteínas, la actividad enzimática y la regulación de la expresión génica, resultando en cambios morfológicos, migración celular, proliferación, diferenciación o muerte.

Las vías de señalización no se encuentran aisladas, sino que están interconectadas y forman redes complejas con múltiples elementos que se interconectan entre sí. En los procesos fisiológicos cada uno de los elemen-

tos está finamente regulado espacial y temporalmente, mientras que la desregulación de vías de señalización lleva al desarrollo de numerosas enfermedades¹. En las últimas décadas se han descrito vías y elementos involucrados en la señalización celular, entre los cuales se encuentran las proteínas Rho GTPasas. Las proteínas Rho forman una de las subfamilias de la superfamilia Ras de GTPasas. Los más de cincuenta miembros de dicha superfamilia se agrupan en función de la homología de su composición aminoacídica en las siguientes subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran que se detallan en la Tabla 1². Estas proteínas tienen pesos moleculares semejantes (20-25 kDa) y se denominan genéricamente "GTPasas pequeñas" (*small GTPases*, o también *small GTP-binding proteins*), diferenciándose así del resto de las proteínas con actividad GTPasa como las proteínas G heterotriméricas.

La subfamilia Rho en mamíferos está formada por varios miembros: RhoA, B, C, D y E; Rac 1, 2 y 3; Cdc42, TC10 y otras. Estas proteínas son estructuralmente muy parecidas (40 a 95% de identidad en su composición

Recibido: 26-VI-2010

Aceptado: 12-VIII-2010

Dirección postal: Dr. Daniel Gómez, Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, R. Sáenz Peña 352, 1876 Bernal, Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4365-7132 e-mail: degomez@unq.edu.ar

TABLA 1.– Clasificación de los miembros de la Superfamilia Ras

Subfamilia	Funciones Principales	Miembros representativos
Ras	Control de la expresión génica, proliferación celular, diferenciación, supervivencia	Ras, Rap, R-Ras, Ral, Rheb (36 miembros)
Rho	Reorganización del citoesqueleto, progresión del ciclo celular, expresión génica	Rac, Rho, Cdc42 (20 miembros)
Rab	Tráfico vesicular, vías endocíticas y secretorias	Rab1, Rab5 (61 miembros)
Ran	Transporte nucleoplasmático de ARN y proteínas	Ran
Arf	Regulación de tráfico vesicular	Arf1, Arf6 (35 miembros)

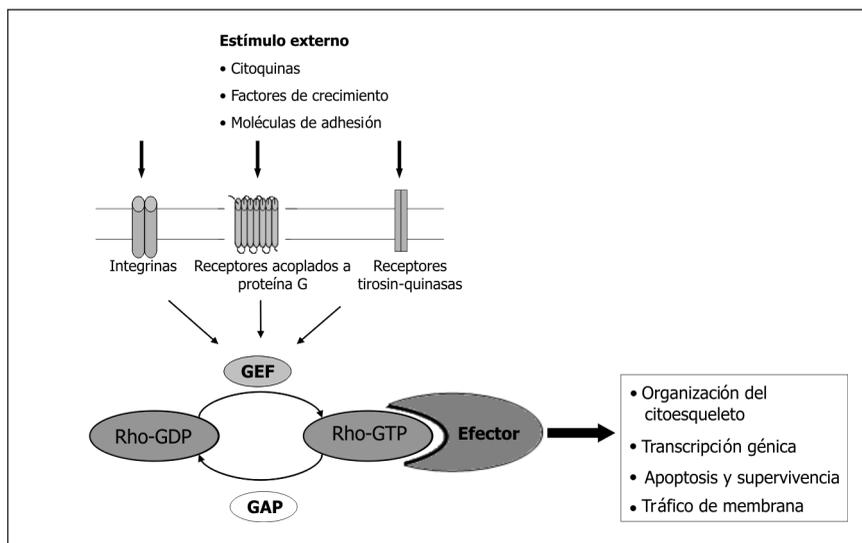


Fig. 1.– Modelo de regulación de Rho GTPasas. Las proteínas actúan como transductores de señales al ser activados por GEFs, que responden a una gran variedad de estímulos extracelulares a través de la activación de diferentes receptores de membrana. La conformación activa de Rho es capaz de unirse a diversos efectores celulares, regulando así variadas funciones celulares.

aminoacídica), además de tener un tamaño muy similar (190-195 aminoácidos)³.

Una de las principales características de las proteínas Rho, como de todas las proteínas G, es que unen nucleótidos de guanina y ciclan entre un estado inactivo unidas a GDP y un estado activo unidas a GTP (Fig. 1). Estas proteínas al igual que Ras tienen actividad GTPasa endógena, pudiendo hidrolizar el GTP a GDP en un proceso dependiente de Mg^{2+} . Se asume que las proteínas de la superfamilia Ras se activan para interactuar con sus efectores cuando se encuentran unidas a GTP, los cuales

a su vez interactúan con otras proteínas produciendo una cascada de señalización.

Las Rho GTPasas tienen dominios funcionales comunes, similares a los de Ras. Estos dominios consisten en cuatro regiones que participan en la unión e hidrólisis del nucleótido de guanina (G1, G3, G4 y G5), una secuencia terminal CXXX (donde C es cisteína y X cualquier otro aminoácido) y una región G2 involucrada en la interacción con moléculas efectoras⁴.

El motivo CXXX localizado en el -COOH terminal actúa como señal para tres modificaciones post-transducciona-

les secuenciales: prenilación, proteólisis y metilación. Las GTPasas sintetizadas *de novo* son citosólicas y posteriormente se modifican por la adición, al grupo sulfhidrilo de la cisteína de un grupo isoprenilo farnesilo de 15 carbonos o geranylgeranilo de 20 carbonos. La proteína prenilada es entonces modificada por proteólisis de los tres últimos aminoácidos en el extremo carboxi-terminal y metilación del grupo carboxilo de la cisteína. Las modificaciones post-transduccionales no afectan la actividad GTPasa pero son esenciales para la función biológica de estas proteínas, ya que controlan su anclaje a la membrana celular y por ende su localización dentro de la célula⁵.

La alternancia entre los estados inactivo-activo de las proteínas Rho está altamente regulada por proteínas que regulan la actividad de GTPasa o el intercambio de nucleótidos. Existen tres clases de proteínas reguladoras: (a) los factores intercambiadores de guanina (GEF, *guanine exchange factors*), que activan a las GTPasas incrementando la tasa de liberación del nucleótido unido y por lo tanto facilitando el intercambio de GDP por GTP; (b) las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP, *GTPase-activating protein*) que estimulan la actividad de GTPasa endógena y así facilitan la hidrólisis de GTP a GDP; (c) los inhibidores de la disociación de GDP (GDI, *GDP-dissociation inhibitors*), que inhiben la disociación del GDP previniendo su reemplazo por GTP^{6,7}.

Las Rho GTPasas regulan la morfología celular y la reorganización del citoesqueleto de actina. De tal forma, Rho puede ser activado por ligandos extracelulares como ácido lisofosfatídico y regular la formación de fibras de estrés. Rac es activado por distintos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o la insulina, dando lugar a la formación de lamelipodios y ondulaciones de membrana conocidas como *ruffles*. En cambio, la activación de Cdc42 produce filopodios⁸⁻¹¹. Los cambios morfológicos inducidos por las formas activadas de esta familia de GTPasas comparten muchos aspectos: incremento en la polimerización de actina, agrupamiento de integrinas y ensamblaje de complejos de proteínas citoesqueléticas (contactos focales). Los contactos focales tienen una función importante en los mecanismos de transducción de señales. La adhesión celular mediada por integrinas dispara la fosforilación en tirosinas, el flujo de iones y el metabolismo lipídico que finalmente, de manera conjunta o individualmente, afectan la expresión de genes, la progresión del ciclo celular y los procesos de apoptosis^{9, 11, 12}.

Además de las acciones sobre el citoesqueleto, Rho, Rac y Cdc42 regulan una gran variedad de funciones celulares, mediando la regulación transcripcional de determinados genes. Rac, por ejemplo, estimula la cascada de Jun quinasa (JNK) y transmite así información al núcleo para regular la expresión de un número importante de genes¹³⁻¹⁵.

Si bien se han descrito diferentes procesos celulares modulados por Rho GTPasas, es importante destacar que los eventos celulares están regulados por redes de señalización intercomunicadas y no por una única cascada de señalización. Es así como un mismo estímulo en diferentes contextos puede provocar diferentes respuestas.

Un ejemplo de intercomunicación entre Rho GTPasas y otras vías es la regulación de la Rac-GAP β 2-quimerina mediante proteína-quinasa C (PKC). En este sentido, se comunicó recientemente que en condiciones normales la β 2-quimerina permanece en un estado inactivo en el citosol. Cuando el receptor de EGF es estimulado, se genera diacilglicerol (DAG) mediante fosfolipasa C y activa a PKC δ , que a su vez fosforila a β 2-quimerina en un residuo de serina. Esta fosforilación impide su traslocación a membrana y permanece inactiva en el citosol. Por otro lado, cuando este GAP no está fosforilado, es activado de manera alostérica por DAG, ya que β 2-quimerina cuenta con un dominio C1 al igual que PKC, y fosfolípidos ácidos en la membrana plasmática donde es capaz de inactivar a Rac¹⁶.

Asimismo, existen evidencias de intercomunicación entre las diferentes Rho GTPasas, donde Rho y Rac se regulan mutuamente modulando así diferentes procesos celulares¹⁷⁻¹⁹.

Principales efectores de Rho GTPasas

La gran variedad de funciones biológicas de los distintos miembros de la familia de las Rho GTPasas está dada por la unión a distintos efectores celulares. Se conocen más de cincuenta efectores de Rho, Rac y Cdc42 que incluyen serina-treonina quinasas, tirosina-quininas, lípido-quininas, lipasas, oxidasas y proteínas estructurales (*scaffold proteins*)²⁰, según se presentan en la Tabla 2.

El grupo de proteínas efectoras más conocidas es el que está involucrado en la reorganización del citoesqueleto de actina. Se conocen al menos dos efectores de Rho, la Rho quinasa (ROCK) y la formina mDia, los cuales se requieren para el ensamblaje de fibras de estrés, la formación de adhesiones focales y la unión de actina a la membrana. Por otra parte, proteínas efectoras de Cdc42 como WASP y N-WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome proteins*) están involucradas en la formación de filopodios. A su vez, estas proteínas se unen directamente a monómeros de actina y activan al complejo Arp2/3, el cual actúa como un sitio de nucleación para comenzar la polimerización²¹. Por su parte, Rac también es capaz de activar el complejo Arp2/3 mediante la interacción con WAVE (*WASP-like verprolin-homologous protein*) provocando la formación de lamelipodios. Otro de los efectores importantes tanto de Rac como de Cdc42 es la familia de PAK (*p21-activated kinase*), capaces de activar a LIM quinasa y así modular la longitud de los microfilamentos.

TABLA 2.— Principales efectores de Rho GTPasas y sus funciones

Proteína efectora	Selectivo para la GTPasa	Funciones
ROCK	Rho	Regulación de miosina y citoesqueleto de actina
mDia	Rho	Organización de actina
WASP, N-WASP	Cdc42	Organización de actina
WAVE	Rac	Organización de actina
PAK	Rac, Cdc42	Organización de actina, vía JNK ^a
IQGAP	Rac, Cdc42	Organización de actina, contactos célula-célula
P67-phox	Rac	Regulación de NADPH oxidasa, producción de especies reactivas de oxígeno
Rhotekin	Rho	Proteína estructural
PI3K	Rac, Cdc42	Niveles de PIP ₃ ^b

^a JNK: *c-Jun N-terminal quinasa*

^b PIP₃: *Fosfatidil inositol 3-fosfato*

De su rol preponderante en la regulación del citoesqueleto de actina, se desprende la contribución de la familia de las Rho GTPasas en la regulación de la morfología celular, las interacciones célula-célula, polaridad celular y migración.

Otro de los procesos regulados por Rho GTPasas es la organización intracelular de microtúbulos jugando un rol importante en la polaridad celular y en la distribución de organelas intracelulares y del huso mitótico. En este caso, proteínas como Op18/estatmina están reguladas por el efector PAK, mientras que el efector IQGAP tiene un rol importante tanto en la organización del citoesqueleto de microtúbulos como de actina²⁰.

Además de su efecto sobre el citoesqueleto, las Rho GTPasas regulan diferentes vías de transducción de señales que llevan a cambios en la expresión génica. Las proteínas Rho regulan a factores de transcripción como SRF (*serum response factor*) y NFκB y a diferentes vías de señales como JNK (*c-jun N-terminal kinase*) y p38 MAP quinasa.

Por otra parte, las Rho GTPasas son capaces de influenciar diferentes actividades enzimáticas. Uno de los primeros blancos de Rac identificados fue p67phox, un componente estructural del complejo NADPH oxidasa que se encuentra en células fagocíticas. A partir de estos datos, se comunicó que Rac promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en varios tipos celulares diferentes, actividad posiblemente mediada por la familia de oxididas Nox²¹.

Las Rho GTPasas controlan múltiples aspectos de la progresión de la fase G1 y de la fase M en el ciclo celular, ya que controlan vías mitogénicas como ERK, activan proteínas, como Par6, claves en la división celular y modulan la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular como ciclina D1.

Papel en enfermedades humanas

Como hemos expuesto, las Rho GTPasas tienen un rol central en la regulación de diversos procesos celulares, por lo que su alteración o desbalance puede ser la causa molecular de diversas enfermedades del ser humano. Debido a que las Rho GTPasas median un gran número de eventos celulares, como reorganización del citoesqueleto, ciclo celular, tráfico vesicular, migración o apoptosis, las aberraciones en las vías de señalización asociadas a estas proteínas, cumplen un rol esencial en un grupo heterogéneo de enfermedades que incluyen a cáncer, desordenes neurodegenerativos, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas.

Cáncer

Se conocen varias mutaciones causantes de afecciones tanto en proteínas reguladoras (GAPs, GEFs, GDIs) como proteínas efectoras de Rho GTPasas²². Sin embargo, sólo se cuenta con un ejemplo de mutación en Rho GTPasas en humanos y corresponde a RhoH encontrado en linfomas no-Hodgkin y mieloma múltiple²³.

Tradicionalmente, se ha asociado la sobreactivación de vías de señalización de Rho GTPasas con la transformación maligna. Las primeras evidencias provienen de ensayos en los que Rac1 constitutivamente activo, y en menor medida RhoA, inducen transformación maligna en fibroblastos y tumorigenicidad en ratones atímicos, siendo además requeridos para la transformación mediada por Ras^{24,25}. Actualmente se conocen muchos tipos de cáncer en los cuales las vías de señalización de Rho GTPasas se encuentran alteradas. Entre ellos se encuentran cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, carcinomas colorrectales, leucemias, osteosarcomas, carcinomas hepatocelulares, neuroblastomas, carcinomas de pulmón (tanto de células pequeñas como de células no-pequeñas), cáncer gástrico y glioblastomas²⁶.

Las Rho GTPasas están implicadas en diferentes procesos asociados al cáncer, como la proliferación celular, migración, invasión y metástasis debido a que estas proteínas son mediadores comunes en múltiples vías oncogénicas. En particular, se estableció que estas proteínas regulan la transición de fase G1 a fase S del ciclo celular de células tumorales, modulando los niveles de expresión de ciclina D1 y de los inhibidores de quinasas dependien-

tes de ciclinas (CDKs)²⁷. Por otro lado, las proteínas Rho influyen en la supervivencia celular, ya que Rac, Rho y Cdc42 regulan positivamente la transcripción mediada por NF κ B²⁸, evitando que las células transformadas entren en apoptosis. Sin embargo, se ha podido demostrar que podrían estar mediando señales anti o pro-apoptóticas en función del contexto celular y tisular²⁹⁻³³.

Con respecto a la motilidad celular, las proteínas Rho cumplen un rol crucial en la adquisición de propiedades migratorias e invasivas de las células tumorales, ya que están implicadas en la remodelación del citoesqueleto de actina, en la adhesión intercelular mediada por cadherinas y en la remodelación de la matriz extracelular³. Particularmente, se publicó que Rac1 es una proteína clave en el proceso invasivo de tumores como el meduloblastoma pediátrico³⁴. En modelos de glioblastoma multiforme Rac1, Rac3 y ciertos GEFs median la capacidad migratoria e invasiva de dichos tumores³⁵⁻³⁷.

En cuanto al estado de las proteínas reguladoras de las GTPasas afectadas, uno de los ejemplos más estudiados en cáncer es el Rac-GEF Tiam1 (*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*). Si bien las GTPasas no son consideradas oncogenes, Tiam1 sí lo es, ya que está implicado en la transformación oncogénica de fibroblastos³⁸.³⁹ El gen *tiam1* fue identificado a partir de un ensayo de mutagénesis insercional en un modelo de linfoma de células T, donde se realizó una selección *in vitro* de clones altamente invasivos. Así se estableció que Tiam1 aumenta la capacidad invasiva y el potencial metastático de células tumorales³⁹. Adicionalmente, los niveles de Tiam1 se encuentran elevados y pueden ser correlacionados con el pronóstico de carcinomas prostáticos humanos y de carcinomas nasofaríngeos y con el grado de progresión de tumores mamarios^{3, 40, 41}.

Por su parte, los niveles de expresión de β 2-quimerina, un GAP específico de Rac, se encuentran significativamente disminuidos tanto en líneas tumorales mamarias humanas como en tumores mamarios con respecto a tejidos normales⁴². La sobreexpresión de β 2-quimerina en un modelo de carcinoma mamario murino provoca la reducción de la tasa de crecimiento tumoral así como también disminuye la capacidad invasiva y el número de metástasis pulmonares⁴³.

Entre los muchos efectores diferentes de Rho GTPasas, cuatro de ellos están directamente vinculados con la transformación maligna mediada por las proteínas Rho. En primer lugar, se puede citar a la familia de las proteínas WASP, las cuales son efectores de Rac y de Cdc42 y están vinculadas con la reorganización del citoesqueleto de actina. Esto impacta sobre la regulación de la migración celular, de la formación de filopodios, ondulaciones de membrana y podosomas. Otro de los efectores descritos es IQGAP, el cual interactúa con Rac1 y Cdc42 y está implicado en la formación de ondulaciones de membrana y en las uniones célula-célula mediadas por E-cadherina^{44, 22}.

El rol de las proteína-quinasa Pak en cáncer está ampliamente descripto. Estas quinasa presentan más de 40 posibles sustratos diferentes y median procesos biológicos como proliferación celular, supervivencia celular, motilidad celular, angiogénesis, crecimiento independiente de sustrato, entre otras⁴⁵. Se ha descripto que mediante Rac activo, Pak es capaz de activar a PKC γ , evento indispensable para la interacción con la proteína fascina mediando la migración celular en un modelo de carcinoma de colon humano⁴⁶.

Por último, se ha descripto a las proteínas de la familia de proteína-quinasa ROCK, efectores directos de las proteínas RhoA, las cuales median efectos sobre el citoesqueleto como formación de fibras de estrés y ensamblaje de adhesiones focales^{44, 22}.

Desórdenes neurodegenerativos

Debido a que las Rho GTPasas están implicadas en distintos fenómenos neuronales, la desregulación de estas vías de señalización está asociada a múltiples desórdenes neurodegenerativos. En particular, las Rho GTPasas están involucradas en la migración y polarización neuronal, en la guía axonal y la formación de dendritas y también en la organización sináptica y en la plasticidad.

El ensamblaje de redes neuronales funcionales en el desarrollo animal se basa en la polarización de neuronas. Diversas señales extra e intracelulares convergen en la regulación del citoesqueleto, siendo las Rho GTPasas uno de los reguladores intracelulares más importantes⁴⁷. En un trabajo muy reciente, se propone a Rac1 y Rac3 como proteínas claves en el desarrollo del sistema nervioso, donde juegan roles complementarios en estadios tardíos del desarrollo neuronal y cerebral⁴⁸.

Se conoce desde hace décadas que el retraso mental está asociado con anomalías en las dendritas y las espinas dendríticas. Sin embargo, en los últimos años se lograron describir algunos mecanismos celulares causantes del retraso mental, la cual es una discapacidad caracterizada por una deficiencia global en habilidades cognitivas. Se clonaron siete genes causantes del retraso mental no específico ligado al cromosoma X, un grupo heterogéneo de desórdenes asociados al cromosoma X. Se sabe que tres de estos genes están asociados directamente a la vía de las Rho GTPasas: un Rho-GAP (oligofrenina1), un efector de Rac y Cdc42 (Pak3) y un GEF de Rac y Cdc42 (α Pix). Diferentes grupos reportaron que mutaciones en estos genes están presentes en el retraso mental no-sindrómico asociado al cromosoma X⁴⁹.

Existen evidencias que indican que el mecanismo de endocitosis, la macropinocitosis, y el posterior tráfico vesicular serían indispensables para la integridad de neuronas motoras. En este sentido, un GEF (Als) y las GTPasas Rab5 y Rac1 están implicadas en estos eventos celulares, viéndose afectadas en enfermedades neurodegenerativas

como la esclerosis lateral amiotrófica, la cual consiste en la disminución gradual y muerte de neuronas motoras provocando parálisis muscular progresiva^{22, 50}. También se han asociado diferentes proteínas implicadas en las vías de Rho GTPasas, como Cdc42 y WASP, en la enfermedad de Huntington, la cual es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta la coordinación muscular y algunas funciones cognitivas⁵¹.

Por otro lado, se comunicó que Pak, efector de las GTPasas Rac y Cdc42, presenta niveles de activación disminuidos y una traslocación aberrante del citosol a la membrana en el cerebro de pacientes con Alzheimer y en ratones transgénicos con enfermedad de Alzheimer⁵².

Otras enfermedades

Se ha especulado sobre el rol de Rho GTPasas en otras enfermedades, incluyendo autoinmunidad y desórdenes inflamatorios. La activación de Rho GTPasas es un evento clave en la coordinación de las respuestas inmunes, en particular en la activación de linfocitos T. Defectos en la regulación de la activación de células T, su expansión y la supervivencia son la base para la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico y la esclerosis múltiple, donde se sugieren a las Rho GTPasas como componentes claves de la patofisiología^{53, 54}.

En el síndrome de Wiskott-Aldrich, que presenta una desregulación inmunológica y microtrombocitopenia, se describió un mecanismo biológico responsable, caracterizado por la desregulación del citoesqueleto de actina en células hematopoyéticas, evento regulado principalmente por proteínas como WASP, Cdc42 y el complejo Arp2/3. Las aberraciones en estas vías de señalización se traducen en defectos en la polarización celular y motilidad⁵⁵.

Adicionalmente, se ha descrito que vías de señalización aberrantes asociadas a la GTPasa Rac1 son claves en afecciones inflamatorias crónicas como la enfermedad de Crohn y de Bowel, causando una resistencia aumentada a la apoptosis de linfocitos T CD4⁺^{56, 57}.

Por otro lado, se cuenta con evidencias en modelos animales que sugieren que la vía mediada por RhoA/ROCK es importante en la patogénesis de la hipertensión pulmonar arterial, enfermedad caracterizada por un aumento progresivo de la presión arterial pulmonar y de la resistencia vascular debido a la vasoconstricción pulmonar y remodelado de la vasculatura, así como también a la inflamación⁵⁸.

Rho GTPasas como blancos terapéuticos

La acumulación de evidencias que relacionan a las Rho GTPasas con diferentes enfermedades humanas, las ha convertido en blancos de diferentes estrategias terapéuti-

cas a nivel molecular, tal como se observa en la Fig. 2. En este sentido, es en cáncer donde más se han estudiado estas estrategias, aunque también existen reportes en trastornos inmunológicos y neurodegenerativos.

Uno de los caminos más prometedores de búsqueda de nuevas terapias para inhibir desarrollo tumoral y metástasis es utilizar como blancos moleculares proteínas clave en vías de señalización oncogénicas. Más aún, el diseño racional de drogas es considerado como la estrategia que revolucionará la clínica en el futuro⁵⁹.

En el caso del cáncer, un blanco molecular ideal sería aquel que resulte esencial para el crecimiento y supervivencia de las células tumorales, pero del cual las células normales pudieran prescindir. Sin embargo, existen pocas proteínas blanco que cumplen con esta premisa. Otro tipo de blanco ideal sería aquel que no está presente en el tejido normal o aquellas proteínas señalizadoras implicadas en el proceso de angiogénesis.

En la práctica, la gran mayoría de los blancos moleculares que permitieron el desarrollo exitoso de nuevas drogas caen en un pequeño número de categorías. Hasta el momento, anticuerpos monoclonales, pequeñas moléculas inhibitoras y la combinación de ambos fueron las estrategias más exitosas en los ensayos clínicos⁶⁰.

Uno de los ejemplos más importantes es el imatinib (Gleevec®), cuyo blanco es la proteína ABL (*Abelson leukemia viral oncogen*), una tirosina-quinasa constitutivamente activa que promueve la proliferación de células mieloides inmaduras. Este compuesto inhibe la fosforilación de proteínas "río abajo" de ABL, inhibiendo a células BCR-ABL positivas^{61, 62}.

Otros ejemplos de drogas desarrolladas bajo el concepto de blanco molecular en cáncer son el monoclonal trastuzumab (Herceptin®) cuyo blanco es el receptor HER2 y el gefitinib (Iressa®) una pequeña molécula inhibidora del receptor de EGF, entre otros⁶². También se han desarrollado estrategias para el diseño de agentes terapéuticos cuyo blanco molecular es PKC, para la cual se han descrito varios puntos de interacción con las vías de Rho GTPasas. Algunos inhibidores de su actividad catalítica, así como también activadores selectivos de diferentes isoenzimas, están siendo estudiados en fase clínica I, II y III⁶³⁻⁶⁶.

Las proteínas Rho participan de manera activa en múltiples procesos celulares, los cuales pueden estar relacionados en particular con la invasión y metástasis tumoral. Existen varios pasos en las vías de señalización de Rho GTPasas que pueden ser blanco de agentes terapéuticos. Las proteínas Rho requieren de la adición post-traducciona de restos lipídicos en su región carboxiterminal, en este sentido se han desarrollado un gran número de compuestos encaminados a prevenir esta modificación. Dentro de estos compuestos están los inhibidores de la farnesil-transferasa y los inhibidores de la geranylgeranilo-transferasa, ambas enzimas son las

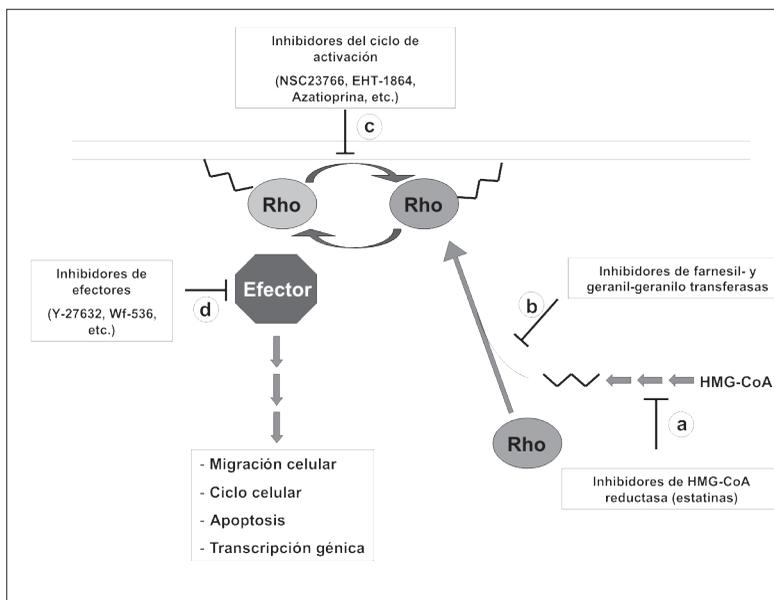


Fig. 2.– Diferentes estrategias utilizadas para interferir en procesos regulados por proteínas Rho. (a) depletar el pool de precursores isoprenoides mediante estatinas. (b) inhibición del agregado de motivos isoprenoides a proteínas Rho inhibiendo farnesiltransferasas y geranylgeranilo-transferasas. (c) inhibición del ciclo de activación de Rho GTPasas, ya sea inhibiendo interacción Rho-GEF (NSC23766), Rho-Efectores (EHT-1864) o acumulando una conformación inactiva de Rho en el citosol (azatioprina). (d) Inhibiendo a efectores de Rho GTPasas.

principales encargadas de la adición de restos lipídicos a las pequeñas GTPasas en general. Estos compuestos demostraron tener un alto efecto antitumoral encontrándose varios en fases clínicas de experimentación^{44, 67}.

También se cuenta con inhibidores de la HMG-CoA reductasa, llamados estatinas, que bloquean la síntesis de precursores isoprenoides, disminuyendo así los niveles de colesterol y de Rho GTPasas con las modificaciones lipídicas requeridas. Una de las posibles desventajas de la inhibición de la isoprenilación es la poca selectividad encontrada para las diferentes GTPasas. Sin embargo, estudios clínicos indican que afectan a la progresión tumoral^{68, 69}. Adicionalmente, hay estudios clínicos en fase I en curso para determinar el efecto de simvastatina sobre la inflamación de las vías aéreas de pacientes con fibrosis quística⁷⁰.

Otra de las estrategias utilizadas ha sido inhibir las proteínas efectoras, modulando así de una forma más específica la vía. El compuesto Y-27632 es un inhibidor específico de la proteína ROCK, una quinasa activada por RhoA. Este compuesto demostró un fuerte efecto anti-metastásico en varios modelos tumorales *in vivo*. Por otro lado, se informó que la utilización de este inhibidor puede disminuir la neurotoxicidad provocada por la exposición a drogas anticancerígenas como cisplatino y metotrexato⁷¹.

Otro inhibidor competitivo de ROCK, el compuesto Wf-536, demostró ser un inhibidor de la angiogénesis, del crecimiento tumoral y de metástasis *in vivo*⁷².

Una tercera estrategia que ha sido explorada es la de inhibir el ciclo de activación de las proteínas Rho. Mutantes de Rho que secuestran los Rho-GEF en complejos no funcionales inaccesibles para las proteínas Rho endógenas son capaces de bloquear la función de estas proteínas. Se ha demostrado que la toxina fúngica brefeldina A interfiere con la GTPasa ARF1, uniéndose al complejo ARF1-GEF y convirtiendo a este en un complejo no funcional⁷³. Al respecto, se han identificado y caracterizado varios compuestos capaces de inhibir esta interacción^{74, 75}. El primer compuesto que se caracterizó es el NSC23766 que inhibe la activación de Rac mediante Tiam1 y Trio, uniéndose a la superficie de Rac impidiendo la interacción con dichos GEFs⁷⁵.

Una de las drogas inmunosupresoras ampliamente utilizada en enfermedades inflamatorias crónicas –como la enfermedad de Bowel– es la azatioprina y su metabolito 6-mercaptopurina. Si bien son drogas ampliamente utilizadas, su mecanismo de acción fue recientemente dilucidado y se propuso a Rac1 como blanco específico en linfocitos T⁵⁷. Posteriormente, nuestro grupo informó que la azatioprina y su metabolito son capaces de disminuir los niveles de Rac1 activo en un modelo de carcinoma mamario murino *in vitro*⁷⁶.

La redundancia entre diferentes vías y la plasticidad de las mismas permite a las células tumorales adaptarse y superar múltiples condiciones estresantes tanto micro-ambientales como terapéuticas. Esto implica que terapias con un único blanco altamente específico no siempre

alcancen los niveles de eficacia esperados. Por ello, se requieren diferentes estrategias terapéuticas⁷⁷.

Una opción es combinar drogas moduladoras de múltiples vías de señalización. Las combinaciones con mejores perspectivas podrían ser las que incluyan a agentes que actúan inhibiendo señales de supervivencia en múltiples vías de transducción.

Dokmanovic y col. demostraron que Rac1 se encuentra sobreactivada en células SKBR3 de cáncer de mama, positivas para ErbB2, que habían adquirido resistencia al trastuzumab (anticuerpo monoclonal que inhibe el receptor ErbB2) a diferencia de la variable parental sensible a este tratamiento⁷⁸. Además, demostraron que la inhibición específica de Rac1 con NSC23766 era capaz de restaurar la sensibilidad al trastuzumab de las células SKBR3 resistentes. En la misma línea, Halatsch y col. demostraron que la sobreexpresión de Rac1 está relacionada con la adquisición de resistencia a erlotinib (anticuerpo monoclonal que inhibe el receptor de EGF) en 9 líneas celulares de glioblastoma multiforme humano⁷⁹. Estos resultados sugieren la potencial acción cooperativa entre compuestos que actúan sobre distintos blancos moleculares vinculados en vías de señalización utilizadas por las células tumorales para mantener el fenotipo transformado.

En el mismo sentido se pueden citar varios casos que han sido publicados o evaluados, entre los cuales se encuentran la combinación de inhibidores del receptor de EGF con inhibidores de la serin-treonina proteína quinasa mTOR, inhibidores de la farnesilación-geranilación de proteínas de la familia Ras en combinación con inhibidores de la quinasa reguladora Chk1, inhibidores de las proteínas de la familia Bcl-2 combinadas con inhibidores de la actividad degradativa del proteosoma, etc.⁷⁷.

Por otro lado, uno de los indicios de progresión tumoral en cáncer mamario y de próstata es el paso de su condición hormono-dependiente a hormono-independiente. Los tumores hormono-dependientes requieren de hormonas específicas para su crecimiento, lo cual los hace sensibles a terapias anti-hormonales, mientras que los tumores hormono-independientes no requieren de tales hormonas específicas para su crecimiento, por lo cual se hacen resistentes a los tratamientos anti-hormonales. En los últimos años se ha reportado que la vía de señalización de Rac1 está implicada en la hormono-independencia de tumores prostáticos *in vitro* e *in vivo*^{80, 81}. Por su parte, el efector Pak y el GEF AND-34 podrían estar asociados a la hormono-independencia en tumores mamaros^{82, 83}. Estos datos sustentarían el uso de terapias antihormonales combinadas con inhibidores de la vía de señalización de Rac en el tratamiento de tumores hormono-independientes de mama y próstata.

Las Rho GTPasas también fueron vinculadas con el aumento del potencial invasivo de glioblastomas posterior a la exposición a radioterapia, una de las estrategias

terapéuticas actuales para el tratamiento de este tipo de tumor altamente refractario. Se propone así la posibilidad de inhibir farmacológicamente la vía de señalización de Rac con el objetivo de aumentar la eficacia terapéutica de la radioterapia⁸⁴⁻⁸⁶.

Está claro que la función de las proteínas Rho contribuye a la pérdida del control del crecimiento celular, al fenotipo invasivo en varios tipos tumorales e incluso a la resistencia al tratamiento. Adicionalmente, se ha establecido el rol preponderante de las Rho GTPasas en enfermedades neurodegenerativas e inmunológicas. Si bien aún quedan muchas preguntas por responder en cuanto a los mecanismos celulares y moleculares mediados por esta familia de proteínas, los estudios existentes muestran el gran potencial terapéutico asociado al diseño racional de drogas cuyos blancos moleculares sean las Rho GTPasas.

Agradecimientos: Georgina Cardama es becaria y Pablo Lorenzano Menna, Daniel Alonso y Daniel Gómez son miembros de la Carrera del Investigador Científico del CONICET. María J. Comin es Investigadora en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial.

Conflictos de interés: No existen conflictos de interés.

Bibliografía

1. Kier de Joffé EB, Mazzone E, Aguirre Ghiso JA. Signaling pathways regulating the expression of proteases during tumor progression. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 34-40.
2. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005; 118: 843-6.
3. Ellenbroek SIJ, Collard JG. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 657-672.
4. Haeusler LC, Blumenstein L, Stege P, Dvorsky R, Ahmadian MR. Comparative functional analysis of the Rac GTPases. *FEBS Lett* 2003; 555: 556-60.
5. Paduch M, Jeleń F, Otlewski J. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* 2001; 48: 829-50.
6. Mertens AE, Roovers RC, Collard JG. Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett* 2003; 546: 11-6.
7. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 355-66.
8. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 133-42.
9. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-208.
10. Kjoller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 1999; 253: 166-79.
11. Symons M. The Rac and Rho pathways as a source of drug targets for Ras-mediated malignancies. *Curr Opin Biotechnol* 1995; 6: 668-74.
12. Schwartz MA, Shattil SJ. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 388-91.
13. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, et al. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 1995; 81: 1137-46.

14. Kaempchen K, Mielke K, Utermark T, Langmesser S, Hanemann CO. Upregulation of the Rac1/JNK signaling pathway in primary human schwannoma cells. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1211-21.
15. Kam AY, Chan AS, Wong YH. Rac and Cdc42-dependent regulation of c-Jun N-terminal kinases by the delta-opioid receptor. *J Neurochem* 2003; 84: 503-13.
16. Griner EM, Caino MC, Sosa MS, et al. A novel cross-talk in diacylglycerol signaling: the Rac-GAP {beta}2-chimaerin is negatively regulated by PKC{delta} mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 2010; 285: 16931-41
17. Bustos RI, Forget MA, Settleman JE, Hansen SH. Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Curr Biol* 2008; 18: 1606-11.
18. Rosenfeldt H, Castellone MD, Randazzo PA, Gutkind JS. Rac inhibits thrombin-induced Rho activation: evidence of a Pak-dependent GTPase crosstalk. *J Mol Signal* 2006; 1: 8.
19. Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 236-41.
20. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 247-69.
21. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; 348: 241-55.
22. Boettner B, Van Aelst L. The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* 2002; 286: 155-74.
23. Preudhomme , Roumier, Hildebrandt, et al. Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* 2000; 19: 2023-32
24. Khosravi-Far R, Solski PA, Clark GJ, Kinch MS, Der CJ. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 6443-53.
25. Qiu RG, Chen J, McCormick F, Symons M. A rol for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11781-5.
26. Gómez del Pulgar T, Benitah SA, Valerón PF, Espina C, Lacal JC. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *BioEssays* 2005; 27: 602-13.
27. Buongiorno P, Bapat B. Rho GTPases and cancer. *Prog Mol Subcell Biol* 2004; 84: 43-8
28. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sánchez-Pérez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 1997; 11: 463-75.
29. Kadara H, Tahara E, Kim HJ, Lotan D, Myers J, Lotan R. Involvement of Rac in fenretinide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2008; 68: 4416-23.
30. Qi H, Juo P, Masuda-Robens J, et al. Caspase-mediated cleavage of the TIAM1 guanine nucleotide exchange factor during apoptosis. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 603-11.
31. Pervaiz S, Cao J, Chao OS, Chin YY, Clément MV. Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* 2001; 20: 6263-8.
32. Nishida K, Kaziro Y, Satoh T. Anti-apoptotic function of Rac in hematopoietic cells. *Oncogene* 1999; 18: 407-15.
33. Murga C, Zohar M, Teramoto H, Gutkind JS. Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene* 2002; 21: 207-16.
34. Zavarella S, Nakada M, Belverud S, et al. Role of Rac1-regulated signaling in medulloblastoma invasion. *J Neurosurg Pediatr* 2009; 4: 97-104
35. Salhia B, Tran NL, Chan A, et al. The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma. *Am J Pathol* 2008; 173: 1828-38.
36. Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, et al. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* 2005; 24: 7821-9.
37. Jarzynka MJ, Hu B, Hui KM, et al. ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion. *Cancer Res* 2007; 67: 7203-11.
38. van Leewen FN, van der Kammen RA, Habets GG, Collard JG. Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3. *Oncogene* 1995; 11: 2215-2221
39. Habets GG, van der Kammen RA, Stam JC, Michiels F, Collard JG. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin. *Oncogene* 1995; 10: 1371-6.
40. Engers R, Mueller M, Walter A, Collard JG, Willers R, Gabbert HE. Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 95: 1081-6.
41. Qi Y, Huang B, Yu L, Wang Q, Lan G, Zhang Q. Prognostic value of Tiam1 and Rac1 overexpression in nasopharyngeal carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2009; 71: 163-71.
42. Yang C, Liu Y, Leskow FC, Weaver VM, Kazanietz MG. Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by {beta}2-chimerin. *J Biol Chem* 2005; 280: 24363-70.
43. Menna PL, Skilton G, Leskow FC, Alonso DF, Gomez DE, Kazanietz MG. Inhibition of aggressiveness of metastatic mouse mammary carcinoma cells by the beta2-chimaerin GAP domain. *Cancer Res* 2003; 63: 2284-91.
44. Aznar S, Fernández-Valerón P, Espina C, Lacal JC. Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy. *Cancer Lett* 2004; 206: 181-91.
45. Dummler B, Ohshiro K, Kumar R, Field J. Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 51-63.
46. Parsons M, Adams JC. Rac regulates the interaction of fascin with protein kinase C in cell migration. *J Cell Sci* 2008; 121: 2805-13.
47. Tahirovic S, Bradke F. Neuronal polarity. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2009; 1: a001644.
48. Corbetta S, Gualdoni S, Ciceri G, et al. Essential role of Rac1 and Rac3 GTPases in neuronal development. *FASEB J* 2009; 23: 1347-57.
49. Ramakers GJA. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 2002; 25: 191-9.
50. Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE. The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 16599-611.
51. Holbert S, Dedeoglu A, Humbert S, Saudou F, Ferrante RJ, Néri C. Cdc42-interacting protein 4 binds to huntingtin: neuropathologic and biological evidence for a role in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2712-7.
52. Ma QL, Yang F, Calon F, et al. p21-activated kinase-aberrant activation and translocation in Alzheimer disease pathogenesis. *J Biol Chem* 2008; 283: 14132-43.
53. Pernis. Rho GTPase-mediated pathways in mature CD4+ T cells. *Autoimmunity Reviews* 2009; 8: 199-203
54. Walters CE, Pryce G, Hankey DJ, et al. Inhibition of Rho GTPases with protein prenyltransferase inhibitors prevents leukocyte recruitment to the central nervous system and attenuates clinical signs of disease in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol* 2002; 168: 4087-94.

55. Thrasher AJ, Burns S. Wiskott-Aldrich syndrome: a disorder of haematopoietic cytoskeletal regulation. *Microsc Res Tech* 1999; 47:107-13.
56. Atreya R, Atreya I, Neurath MF. Novel signal transduction pathways: analysis of STAT-3 and Rac-1 signaling in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1072: 98-113.
57. Tiede I, Fritz G, Strand S, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003; 111: 1133-45.
58. Barman SA, Zhu S, White RE. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5: 663-71
59. Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 111-37.
60. McCormick F. Small-molecule inhibitors of cell signaling. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 593-7.
61. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347: 472-80
62. Ding J, Feng Y, Wang HY. From cell signaling to cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1494-8.
63. Mackay HJ, Twelves CJ. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 554-62.
64. Paz-Ares L, Douillard JY, Koralewski P, et al. Phase III study of gemcitabine and cisplatin with or without aprinocarsen, a protein kinase C- α antisense oligonucleotide, in patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1428-34
65. Hampson P, Chahal H, Khanim F, et al. PEP005, a selective small-molecule activator of protein kinase C, has potent antileukemic activity mediated via the delta isoform of PKC. *Blood* 2005; 106: 1362-8.
66. Ogbourne SM, Hampson P, Lord JM, Parsons P, De Witte PA, Suhrbier A. Proceedings of the First International Conference on PEP005. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 357-62.
67. Mazieres J, Pradines A, Favre G. Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett* 2004; 206: 159-67.
68. Farina HG, Bublik DR, Alonso DF, Gomez DE. Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 551-9.
69. Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 10-9.
70. Effect of Simvastatin on CF Airway Inflammation. En: www.ClinicalTrials.gov; consultado el 31 de mayo de 2010.
71. James SE, Burden H, Burgess R, et al. Anti-cancer drug induced neurotoxicity and identification of Rho pathway signaling modulators as potential neuroprotectants. *Neurotoxicology* 2008; 29: 605-12.
72. Fritz G, Kaina B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6: 1-14.
73. Chardin P, McCormick F, Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 1999; 97: 153-5
74. Shutes A, Onesto C, Picard V, Leblond B, Schweighoffer F, Der CJ. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem* 2007; 282: 35666-78.
75. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7618-23.
76. Lorenzano Menna P, Parera RL, Cardama GA, Alonso DF, Gomez DE, Farina HG. Enhanced cytostatic activity of statins in mouse mammary carcinoma cells overexpressing β 2-chimaerin. *Mol. Med Reports* 2009; 2: 97-102.
77. Dent P, Curiel DT, Fisher PB, Grant S. Synergistic combinations of signaling pathway inhibitors: mechanisms for improved cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2009; 12: 65-73.
78. Dokmanovic M, Hirsch DS, Shen Y, Wu WJ. Rac1 contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells: Rac1 as a potential therapeutic target for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 1557-69.
79. Halatsch ME, Löw S, Hielscher T, Schmidt U, Unterberg A, Vougioukas VI. Epidermal growth factor receptor pathway gene expressions and biological response of glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. *Anticancer Res* 2008; 28: 3725-8.
80. Lyons LS, Rao S, Balkan W, Faysal J, Maiorino CA, Burnstein KL. Ligand-independent activation of androgen receptors by Rho GTPase signaling in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 597-608.
81. Knight-Krajewski S, Welsh CF, Liu Y, et al. Deregulation of the Rho GTPase, Rac1, suppresses cyclin-dependent kinase inhibitor p21(CIP1) levels in androgen-independent human prostate cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 5513-22.
82. Felekis KN, Narsimhan RP, Near R, et al. AND-34 activates phosphatidylinositol 3-kinase and induces anti-estrogen resistance in a SH2 and GDP exchange factor-like domain-dependent manner. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 32-41.
83. Cai D, Iyer A, Felekis KN, et al. AND-34/BCAR3, a GDP exchange factor whose overexpression confers antiestrogen resistance, activates Rac, PAK1, and the cyclin D1 promoter. *Cancer Res* 2003; 63: 6802-8.
84. Hwang SY, Jung JW, Jeong JS, et al. Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in C6 rat glioma cells. *Int J Cancer* 2006; 118: 2056-63.
85. Delmas C, Heliez C, Cohen-Jonathan E, et al. Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int J Cancer* 2002; 100: 43-8.
86. Zhai GG, Malhotra R, Delaney M, et al. Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *J Neurooncol* 2006; 76: 227-37.