

4. TERAPIAS MOLECULARES. DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA CLÍNICA

Dra. María Giselle Peters
Investigadora del CONICET. Departamento de Biología Celular. Área Investigación

1. TERAPIAS MOLECULARES. CONCEPTOS

El cáncer es una enfermedad compleja y multifactorial, en la cual se han identificado condiciones poligénicas y poliepigénicas; estas últimas probablemente inducidas por ciertos estilos de vida y exposiciones ambientales. Las diferentes alteraciones genéticas que participan en el desarrollo y progresión del cáncer incluyen deleciones, amplificaciones, mutaciones puntuales del ADN y rearrreglos cromosómicos. La identificación, a través de la investigación básica, de las moléculas y/o vías de señalización intracelular relacionadas con la carcinogénesis y la progresión tumoral, ha permitido descubrir y desarrollar estrategias basadas en la utilización de moléculas con actividad biológica específicas o terapias moleculares dirigidas (TMD). Algunas TMD aprobadas recientemente son usadas en la práctica clínica diaria. Las tecnologías de punta en genómica y proteómica pueden colaborar en la determinación de la respuesta *in vitro* e *in vivo* de las TMD.

El concepto de "terapia dirigida" fue sacado de la idea de "bala mágica", elaborada inicialmente por Paul Erlich a finales de 1800. Erlich describió una sustancia química con la capacidad de atacar específicamente a microorganismos. Un siglo más tarde, el progreso de la biología molecular contribuyó al entendimiento de los mecanismos subyacentes relacionados con la iniciación, promoción y progresión del cáncer. Las TMD comprenden agentes que bloqueando

los oncogenes o las vías oncogénicas de señalización, pudiendo de manera secundaria detener la carcinogénesis y la progresión tumoral. Algunas de las drogas desarrolladas se muestran en el cuadro I (ver al final del capítulo). Todos estos agentes son utilizados en la práctica clínica o están en fase III.

Fundamentalmente, estas estrategias terapéuticas se basan en (ver figura 1 al final del capítulo):

Uso de anticuerpos monoclonales (moAb) dirigidos contra el ligando.

Uso de moAb dirigidos contra el dominio de unión al ligando del receptor. Pueden estar acoplados a alguna molécula terapéutica.

Uso de moléculas pequeñas que inhiban la actividad de algunas de las enzimas involucradas. Generalmente compiten por el sitio de unión a ATP de las quinasas.

Entre los blancos moleculares a los que apuntan las estrategias terapéuticas se encuentran receptores de factores de crecimiento, moléculas de señalización, proteínas del ciclo celular, moduladores de la apoptosis, moléculas involucradas en la invasión y la angiogénesis, y supresores metastásicos (ver figura 2 al final del capítulo). En esta revisión, y con el objetivo de comprender las bases de las terapias moleculares, se describirán brevemente las principales vías de señalización involucradas en el desarrollo tumoral.

2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN EL DESARROLLO TUMORAL

2.1. Vía Akt/PKB.

Entre las vías de señalización que responden a una amplia gama de señales, Akt posee un pa-

pel central en la regulación del metabolismo, la supervivencia celular, la motilidad, la transcripción génica y la progresión del ciclo celular. Akt pertenece a la subfamilia AGC de la superfamilia de proteínas quinasa, que consiste en 518 miembros en humanos y que se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución. Existen tres isoformas en mamíferos, Akt1, Akt2 y Akt3 (también conocidas como PKB α , PKB β y PKB γ), las cuales comparten una estructura conservada.

Akt es un componente río abajo clave en la señalización por Fosfatidil Inositol 3 quinasa (PI3K), la cual puede ser activada por: 1) receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs), 2) receptores acoplados a proteínas G y 3) integritinas. Asimismo, la vía Akt puede ser activada por señales mediadas por Ras o regulada negativamente por la fosfatasa PTEN (ver figura 3 al final del capítulo).

Akt se halla probablemente involucrada en la resistencia a la apoptosis adquirida por una fracción sustancial de tumores humanos. Esta quinasa promueve la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis mediante la fosforilación inactivante de varios blancos, incluyendo Bad, el factor de transcripción Forkhead, Caspasa-9, JNK y GSK3 β . Además, puede activar blancos como NF κ B y MDM2 (inhibidor de p53), bloqueando de esta manera la muerte celular. Asimismo, se sabe que Akt regula negativamente los niveles de los CDKs p21 y p27, favoreciendo así la progresión del ciclo celular.

mTOR es otro blanco molecular de la vía el PI3K/Akt. Esta molécula juega un papel clave en el crecimiento celular y la homeostasis y es regulado de modo anormal en los tumores. Por estos motivos, mTOR está siendo actualmente investigado como un blanco potencial para la terapia anti-cáncer.

2.2. Vías MAPKs

Las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPKs), son serina-treonina quinasa que se fosforilan rápidamente después de la estimulación de una variedad de receptores de la superficie celular. Su función es convertir el estímulo extracelular en una señal intracelular que controla la expresión de genes esenciales para va-

rios procesos, como crecimiento, diferenciación, muerte, transformación maligna y progresión del ciclo celular. Esta familia consta de 3 miembros: extracellular-regulated kinase (Erk), c-jun NH2-terminal kinase (JNK), y the high osmolarity glycerol response kinase p38 (ver figura 4 al final del capítulo).

El camino de señalización de las MAPKs posee cuatro niveles de cascada, donde cada quinasa activa a su sustrato, otra quinasa, a través de una compleja red. En el último nivel, las MAPKs son fosforiladas en tirosina y treonina por las quinasa de la familia MEK (también llamadas MAPKKs o MKKs). La activación de las MAPKKs es mediada por otras quinasa denominadas MAPKKKs, y la activación de estas últimas es mediada por pequeñas proteínas G.

2.2.1. Vía MAPK Erk1/2

Erk1 y Erk2 son las isoformas "clásicas" de las MAPKs. Tanto Erk1 como Erk2 (llamadas Erk1/2) son activadas por MAP/Erk kinase 1 (MEK1) y MEK2 (llamadas MEK1/2), ambas miembros de la familia MAPKK. Una vez activados por una variedad de mitógenos, Erk1/2 fosforilan diversos sustratos, incluyendo factores de transcripción, como Elk1 y c-Myc, y proteínas quinasa, como la quinasa ribosómica S6 (RSK). De esta manera, se induce la expresión de genes tempranos, como c-Fos. Erk1/2 es, por lo tanto, un importante colaborador de la proliferación celular.

Tanto la duración como la intensidad de actividad Erk son importantes. La activación constitutiva de la vía de señalización MAPK Erk1/2 está asociada con la transformación neoplásica de una variedad de células tumorales humanas.

2.2.2. Vía MAPK p38

El camino de señalización MAPK p38, regula varios procesos celulares incluyendo inflamación, producción de citoquinas, diferenciación, crecimiento y muerte celular. Existe una alta correlación entre la activación de este camino de señalización y la apoptosis, aunque la función de p38 puede variar según el tipo celular. Esta molécula es activada en respuesta a varios estímulos extracelulares, como radiación ultravioleta, estrés oxidativo, hipoxia, isquemia, shock

osmótico y citoquinas inflamatorias como Interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). La familia de MAPK p38 consta de 4 isoformas (α , β , γ , y γ).

Distintas evidencias sugieren que luego de su activación p38 se transloca al núcleo, aunque otros datos indican que p38 activado puede también estar presente en el citoplasma y en las mitocondrias. Entre la gran cantidad de moléculas reguladas por p38 se encuentra p53, típico promotor apoptótico a la remodelación del citoesqueleto.

2.2.3. Vía MAPK JNK

Otra clase de MAPK está formada por un conjunto de enzimas activadas por el estrés celular, que reciben el nombre de SAPK (stress activated protein kinase). Las SAPKs fueron identificadas por su capacidad de fosforilar el N-terminal del factor de transcripción c-jun, por lo tanto han recibido también el nombre de quinasas de c-jun (JNKs). La familia incluye 3 isoformas denominadas JNK 1, 2 y 3.

Este camino de señalización además de ser activado por estrés, responde a factores de crecimiento. De modo similar a p38, media señales que regulan la muerte celular programada, la producción de citoquinas y la progresión del ciclo celular.

Entre los genes blanco modulados por esta vía se encuentran Ciclina A2 y COX-2. JNK tiene además un papel central en la vía Wnt no canónica, induciendo apoptosis y reestructuración del citoesqueleto de actina.

2.3. Vía Wnt

Los Wnts son poderosos reguladores de la proliferación y la diferenciación celular, y su camino de señalización involucra proteínas que participan directamente en la transcripción génica y en la adhesión celular. Los Wnts son glicoproteínas secretadas al medio por distintos tipos celulares que actúan mayormente de modo parácrino. Han sido descritos hasta el momento 19 factores Wnts que se expresan en mamíferos.

La alteración de la vía de señalización Wnt ha sido identificada como un evento clave en el desarrollo neoplásico.

Recientemente ha sido determinado que la vía Wnt incluye al menos tres subvías: 1) la vía canónica, 2) la vía no-canónica o de polaridad celular planar (PCP) y 3) la vía dependiente de calcio (ver figura 5 al final del capítulo). En un principio se postuló que cada factor Wnt interactuaba con receptores específicos que estimulaban una subvía en particular. Sin embargo, hoy se conoce que un factor Wnt puede estimular distintas subvías según el entorno celular.

2.3.1. Vía Wnt canónica

β -Catenina es la molécula clave de la vía canónica, la cual además de actuar como un cofactor de transcripción, es un adaptador estructural entre Cadherinas y el citoesqueleto de actina.

En ausencia de estímulo β -Catenina se une a un complejo de degradación integrado por proteínas como APC, CKI y GSK3 β . La asociación de β -Catenina con dicho complejo resulta en su fosforilación, induciéndose así su ubiquitinación y degradación por el proteasoma.

Esta vía es activada por factores Wnt considerados canónicos, como por ejemplo: Wnts 1, 3A, 8, 2B y 7A. Luego de la interacción con el receptor, la señal es transmitida mediante la fosforilación de la molécula Dishevelled (Dsh), la cual inhibe la degradación de β -Catenina al bloquear la función de la quinasa GSK3 β . En estado de activación la β -Catenina se estabiliza, para luego translocarse al núcleo donde se asocia a los factores de transcripción de la familia TCF/LEF (Factor de células T/Factor de estimulación linfoide) y regula la expresión de genes de supervivencia celular como myc y Ciclina D1, así como la expresión de moléculas de adhesión (CD44 y E-Cadherina) y de componentes de la matriz extracelular (Colágeno tipo I).

La proteína β -Catenina también se encuentra involucrada en la adhesión celular ya que se asocia a la glicoproteína transmembrana E-Cadherina, formando los complejos de adhesión célula-célula. De esta manera, las Cadherinas pueden influir sobre la señalización Wnt secuestrando β -Catenina. La sobreexpresión de Cadherinas ha demostrado ser antagonista de las funciones de señalización de β -Catenina.

2.3.2. Vía Wnt no canónica

La vía Wnt no canónica tiene como molécula central a JNK y está involucrada en procesos morfogenéticos, modulando el citoesqueleto y la polaridad celular. Esta vía es activada luego de la estimulación con factores como Wnt 5A y 11, los que interactúan con los receptores de la familia Frizzled y otras moléculas que activan, mediante la fosforilación de Dsh, a pequeñas GTPasas y a JNK. Entre las pequeñas GTPasas se encuentran las de la familia Rho: RhoA, Rac1 y Cdc42.

3. SUPRESORES METASTÁSICOS E IMPLICANCIAS TERAPÉUTICAS

La diseminación metastásica es un factor crítico en el pronóstico de los pacientes oncológicos que contribuye significativamente con la mortalidad. Mientras que la mayoría de las lesiones metastásicas no son tratables por cirugía, la quimioterapia, terapia hormonal y radiación sólo tienen fines paliativos, ofreciendo algunas pocas una pequeña ampliación de la supervivencia. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de un nuevo enfoque en la terapia que apunte de manera específica a las células tumorales metastásicas. Para alcanzar este objetivo es necesario primero tener una comprensión más amplia de los mecanismos moleculares de la metástasis. Aunque la cascada metastásica requiere múltiples pasos para ser completada, la eliminación de un solo eslabón de esta cadena sería capaz de frustrar el proceso. Han sido descritas una serie de moléculas, denominadas supresores metastásicos, capaces de inhibir el desarrollo de metástasis (ver cuadro 2 al final del capítulo). Así, la restauración de proteínas supresoras de metástasis en células tumorales capaces de metastatizar podría producir un beneficio clínico en aquellos pacientes en los que el proceso metastásico no haya sido completado. Básicamente, hay tres maneras de restaurar funcionalmente a las proteínas supresoras de metástasis: a) reconstituir la expresión del supresor metastásico mediante la inducción del locus endógeno o por terapia génica, b) administrar la proteína supresora de manera directa, c) activar las vías downstream que son moduladas por la proteína supresora. La selección de estos

criterios dependerá del defecto que condujo a la pérdida de expresión de la proteína supresora metastásica.

El primer supresor metastásico que se trató de explotar terapéuticamente fue nm23. Científicos del laboratorio de la Dra. Steeg utilizaron las características del promotor de nm23, que está regulado por la vía de respuesta a glucocorticoides. Dado que su objetivo era establecer una terapia que indujera la expresión de nm23, era necesario encontrar un medicamento capaz de hacerlo, relativamente no tóxico y con una dosis tolerada fácilmente. Los autores observaron que la dexametasona aumentaba la expresión de nm23 en células de líneas de carcinoma mamario metastásico. Además, la medroxiprogesterona (MPA), un agonista glucocorticoide atípico, elevaba la expresión de nm23 e inhibía la colonización en agar blando a través del receptor de glucocorticoides. El efecto del MPA fue probado también en un modelo in vivo, empleando la línea celular de carcinoma mamario MDA-MB-231. El tratamiento con MPA inhibió la incidencia, el número y el tamaño de las metástasis, y estos efectos se asociaron a la reexpresión de nm23. Sobre la base de esta evaluación preclínica fue iniciado un ensayo de Fase II en pacientes con metástasis en ganglios linfáticos, portadores de tumores receptor de estrógeno y progesterona negativos. Se ha informado también que la expresión de nm23 puede ser reinducida por el tratamiento con ácido retinoico y estradiol. En 2006, Li y colaboradores utilizaron la transferencia del gen de nm23 mediada por adenovirus y evaluaron si esto evitaba la metástasis del cáncer de ovario en un modelo animal. Esta terapia se asoció a una reducción del 60% en el número de animales que desarrollaron metástasis hepáticas y una prolongación de 35 días en la mediana de la supervivencia.

Ha sido reportada también la reinducción de la función de un supresor metastásico endógeno, para el caso de KAI1. Como p53 regula la transcripción de KAI1, Mashimo y colaboradores utilizaron etopósido (un agente que induce p53) y comprobaron que este tratamiento activa la expresión del gen de KAI1 de forma dosis-dependiente, en líneas celulares de cáncer de próstata humanos, así como en células humanas de

cáncer de pulmón. Se especuló que el tratamiento con etopósido en pacientes podría inducir la expresión de KAI1. Otra posible estrategia terapéutica para la reexpresión de KAI1 en cáncer de próstata se basó en el uso de la isoflavona de soja genisteína, derivado de fito-estrógeno.

La segunda estrategia mencionada consiste en la administración directa de la proteína supresora de metástasis. En este sentido, Ohtaki y colaboradores demostraron que la metástasis pulmonar espontánea de las células del melanoma B16-BL6 es suprimida de manera significativa por la administración del péptido KISS-derivado. Su hipótesis fue que KISS1 podría ser administrada a los pacientes. Aunque esta estrategia ha sido puesta en duda, parece ser prometedora. Un informe más reciente describe el desarrollo de una pequeña molécula mimética de KISS1, lo que sugiere otro posible enfoque para la administración de este supresor metastásico.

Por otra parte, además de las tácticas dirigidas directamente a los supresores metastásicos, también es posible orientar estas estrategias hacia las moléculas downstream de los supresores. Este enfoque implica la identificación de moléculas "druggables" asociadas con la pérdida de expresión de las proteínas supresoras metastásicas. Entre estos estudios, un informe reciente se focalizó en RhoGDI2, proteína inicialmente identificada por el grupo Theodorescu como un supresor metastásico en cáncer de vejiga humano. Debido a que la reconstitución de la proteína RhoGDI2 es actualmente impracticable, Tito

y colaboradores se propusieron identificar proteínas clínicamente "druggable" o vías downstream de RhoGDI2. Entre ellas, se identificó a ET-1 (endotelina 1), un potente vasoconstrictor cuyo efecto sobre el receptor de la endotelina A puede ser antagonizado por clorhidrato atrasentan. Atrasentan se encuentra actualmente en ensayos Fase III para pacientes con cáncer de próstata en estadio IV.

Nuestro grupo, perteneciente al Área Investigación del Instituto Ángel H. Roffo, ha identificado a Glipicano-3 (GPC3) como una molécula capaz de inhibir el desarrollo de metástasis pulmonares en un modelo de cáncer de mama murino. Al igual que otros supresores metastásicos, GPC3 modula vías de señalización implicadas en el crecimiento, la viabilidad, la adhesión y la motilidad celular. Dado su potencial clínico, nuestro grupo se encuentra actualmente profundizando el análisis de su red de señalización molecular.

4. CONCLUSIÓN

El entendimiento de las bases moleculares de la progresión tumoral aumenta las posibilidades de modificar el curso de la enfermedad. Los conocimientos que se obtienen a partir de la investigación básica de las moléculas y/o las vías de señalización implicadas en la iniciación, promoción y progresión del cáncer ofrecen una importante oportunidad para el desarrollo de terapias "inteligentes" (o terapias moleculares dirigidas), pudiéndose combinar la terapia estándar con agentes específicos contra un blanco particular.

Cuadro 1. Principales blancos moleculares para el tratamiento de tumores sólidos.

Droga	Clase	Mecanismo de acción
Gefitinib	Pequeña molécula (anilinoquinazoline)	Inhibidor de la TK de EGFR
Erlotinib	Pequeña molécula (quinazoline)	Inhibidor de la TK de EGFR
Cetuximab	Anticuerpo monoclonal (ch IgG1)	Bloqueante de EGFR
Panitumumab	Anticuerpo monoclonal (hu IgG1)	Bloqueante de EGFR
Trastuzumab	Anticuerpo monoclonal (hu IgG1)	Bloqueante de HER-2
Lapatinib	Pequeña molécula	Inhibidor de EGFR y HER-2
Bevacizumab	Anticuerpo monoclonal (hu IgG1)	Bloqueante de VEGF
Sorafenib	Pequeña molécula multi-blanco	Inhibidor de la TK de VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFRB, Raf, c-Kit, y Flt-3
Sunitinib	Pequeña molécula multi-blanco	Inhibidor de la TK de VEGFR, PDGFR, cKit, y Flt-3

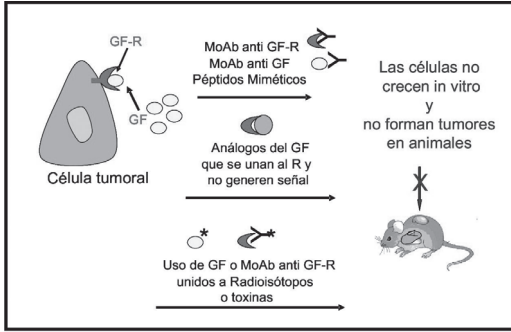
Abreviaciones: ch, quimérico; EGFR, epidermal growth factor receptor; HER-2, human epidermal growth factor receptor 2; hu, humano;

PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; TK, tyrosine kinase; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Cuadro 2. Genes supresores metastásicos

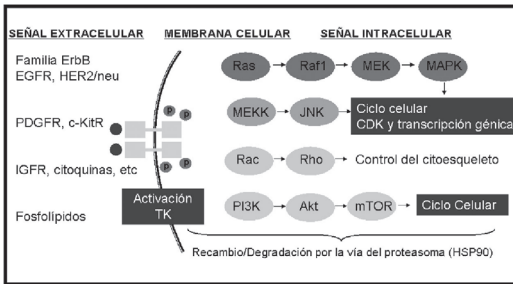
Cellular localization	Suppressor	Function	Target organs	Potential targeting strategies	
NUCLEAR	BRMS1	Gap junctions, chromatin and transcriptional regulation	Skin, bladder, ovary	Not published	
	Drg-1	Unknown	Colon, breast, prostate	Induced by iron chelators, p53 and PTEN expression	
	Nm23	NDP kinase, histidine kinase and exonuclease	Breast, skin,oral, colon	Re-induction of endogenous gene viral gene therapy; MPA	
	DLC-1	Signaling via Rho-GTPase	Liver, non small cell lung	Re- induction of endogenous gene through HDAC inhibitors	
	Gelsolin	Cytoskeleton regulation	Lung,bladder	Not published	
	MKK4/MKK7/p38	Signal transduction	Prostate,ovary	Antibody- mediated activation pathway upstream of MKK4	
	RhoGD12	Signaling pathways regulation (migration and cytoskeleton)	Bladder	Inhibition of downstream genes	
	RKIP	Modulator of Raf-MEK signaling and cytoskeletal organization	Prostate,breast	Epigenetic re- induction of endogenous gene	
	RRM1	Involved in PI3K signaling (cytoskeletal architecture and adhesion)	Neuroblastoma, esophagus,bladder	Not published	
	SseCKs	Src, PKC and Rho signaling regulation	Prostate	Not published	
CYTOPLASMIC	Caspase-8	Protease	Neuroblastoma	Not published	
	DCC	Involved in cytoplasmic architecture and MAPK signaling	Glioblastomas, colorectal,intestine pancreas,prostate	Not published	
	SECRETED	KISS1	Ligands to a G protein-coupled receptor	Skin, breast,ovary	Direct therapeutic administration of suppressor protein
		Glypican-3	Involved in cell growth and differentiation	Breast	Not published
	TIMP	Metalloproteinases inhibitors	Colon	Not published	
	MEMBRANE	Cadherins	Cell-cell or cell-matrix adhesion regulation	Lung	Re- induction of E-cadherin expression through PP1 and PP2
		CD44	Involved in cell-cell or cell-matrix adhesion	Prostate	Not published
		KAI1	DARC interaction; EGFR desensitization	Prostate, breast, skin,pancreas, liver, bladder, esophagus	Re-induction of endogenous gene by plant extracts, viral and non-viral gene therapy
		OGR1	G-protein coupled receptor signaling	Liver, lung, kidney, stomach, diaphragm, spleen,prostate	Not published

Figura 1. Anticuerpos monoclonales y pequeñas moléculas



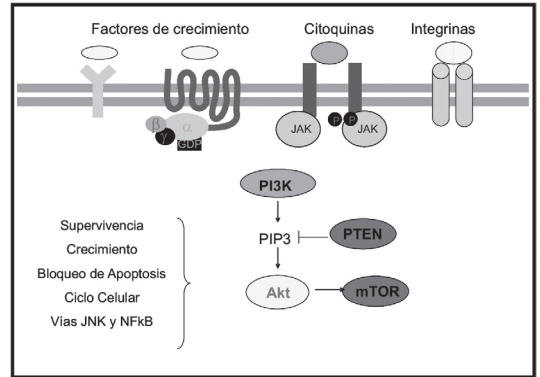
En los últimos años han sido desarrollados una variedad de anticuerpos monoclonales y pequeñas moléculas dirigidos contra los factores de crecimiento (GF) y/o receptores (GF-R) involucrados en las vías de señalización que controlan la iniciación, promoción y progresión del cáncer.

Figura 2. Blancos moleculares de las vías de la traducción de señales



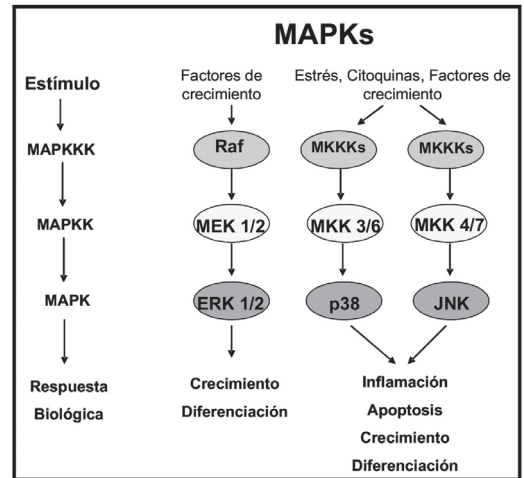
Los blancos empleados en la terapia molecular del cáncer incluyen receptores de factores de crecimiento, moléculas de señalización, proteínas del ciclo celular, moduladores de la apoptosis, y moléculas involucradas en la invasión y la angiogénesis.

Figura 3. Esquema de la vía Akt/PKB



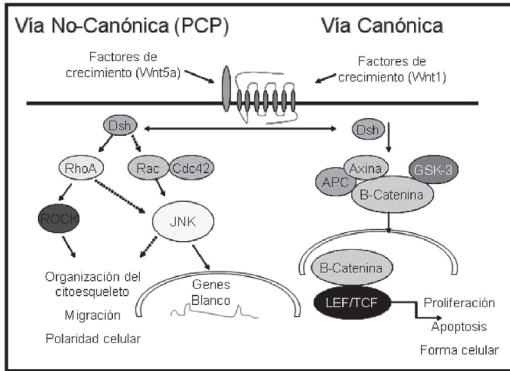
La proteína quinasa Akt es un mediador celular que puede ser activado por una gran variedad de estímulos y producir diversas respuestas. PI3K es una de las principales moléculas involucradas en su activación mientras que PTEN es un clásico inhibidor.

Figura 4. Esquema de las vías MAPKs



En el esquema se representan algunos de los miembros de la cascada MAPK. Mek1 y 2 fosforilan a Erk; MKK3, 4 y 6 fosforilan a p38 y MKK4 y 7 fosforilan a JNK. La proteína-G Ras activa la vía Erk mientras que Rac1, Cdc42, RhoA y RhoB activan las vías p38 y JNK.

Figura 5. Esquema de las vía Wnt canónica y no canónica



La activación de estos caminos de señalización se produce luego de la interacción de los factores Wnt con los receptores de la familia Frizzled de siete pasos transmembrana. El hecho de que las vías compartan elementos upstream podría jugar un papel importante en la regulación de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Agarwal R, Liebe S, Turski ML, Vidwans SJ, Janku F, Garrido-Laguna I, et al. Targeted therapy for genetic cancer syndromes: Von Hippel-Lindau disease, Cowden syndrome, and Proteus syndrome. *Discovery Medicine*. 2015;19:109-16.
- 2- Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004;1697:3-16.
- 3- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*. 1998;74:49-139.
- 4- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298:1911-2.
- 5- Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 2003;101:4667-79.
- 6- Stigliano I, Puricelli L, Filmus J, Sogayar MC, Bal de Kier Joffe E, Peters MG. Glypican-3 regulates migra-

tion, adhesion and actin cytoskeleton organization in mammary tumor cells through Wnt signaling modulation. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;114:251-62.

- 7- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 1997;11:3286-305.

- 8- Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell*. 1998;94:109-18.

- 9- Buchanan C, Lago Huvelle MA, Peters MG. Metastasis suppressors: basic and translational advances. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12:1948-60.

- 10- Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3:55-63.

- 11- Li J, Zhou J, Chen G, Wang H, Wang S, Xing H, et al. Inhibition of ovarian cancer metastasis by adeno-associated virus-mediated gene transfer of nm23H1 in an orthotopic implantation model. *Cancer Gene Therapy*. 2006;13:266-72.

- 12- Mashimo T, Bandyopadhyay S, Goodarzi G, Watabe M, Pai SK, Gross SC, et al. Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochem Biophys Res Comm*. 2000;274:370-6.

- 13- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KISS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2001;411:613-7.

- 14- Peters MG, Farias E, Colombo L, Filmus J, Puricelli L, Bal de Kier Joffe E. Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;80:221-32.

- 15- Buchanan C, Stigliano I, Garay-Malpartida HM, Rodrigues Gomes L, Puricelli L, Sogayar MC, et al. Glypican-3 reexpression regulates apoptosis in murine adenocarcinoma mammary cells modulating PI3K/Akt and p38MAPK signaling pathways. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119:559-74.