



“Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



30 AÑOS

A.9. Desafíos de biotecnología y bioquímica

En búsqueda de proteínas que expliquen la metástasis del cáncer

Autora: Lic. Moscoso, Verónica V.; veronica.vmoscoso@gmail.com

Co-autores: Ferremi, Fiorella; fioferremi1@gmail.com; Dominguez Muller, Haiko; haikodmuller@gmail.com;

Profesora guía: Dra. Cattaneo, Elizabeth; elizabethcattaneo@gmail.com

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata. Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner (INIBIOLP)-CONICET
Universidad Nacional de La Plata**

Resumen

La enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) cataliza el primer paso y limitante en la síntesis de triglicéridos (TAG) y demás glicerolípidos en células de mamíferos. Hasta el momento, se han clonado cuatro isoformas de GPAT, cada una de ellas producto de un gen diferente. En órganos lipogénicos, como el hígado o tejido adiposo, las principales isoformas de GPAT expresadas son GPAT1, 3 y 4 mientras que la GPAT2 tiene un patrón de expresión restringido a células de línea germinal masculina en condiciones fisiológicas y a ciertos tipos tumorales en condiciones patológicas. Este patrón de expresión de GPAT2 sugiere un rol novedoso para esta isoforma, pudiendo estar relacionado con el alto grado de proliferación y/o supervivencia celular que presentan estos tejidos.

Mediante técnicas de biotecnología y biología molecular realizamos el silenciamiento de la expresión de GPAT2 en células de adenocarcinoma mamario humano (MDA-MB-231). Pudimos evaluar la capacidad de migración e invasión de células MDA-MB-231 y observamos que el silenciamiento de GPAT2 disminuye la capacidad de migración e invasión de estas células. Estos resultados nos permiten proponer a GPAT2 como uno de los genes cuya expresión define la capacidad metastásica de esta línea celular.

Palabras clave: glicerol-3-fosfato aciltransferasa, cáncer, metástasis



1. Introducción

El cáncer de mama y el cáncer colorrectal son los de mayor incidencia dentro de la población de Argentina ([IARC Argentina](#)), y en este tipo de cánceres la muerte muchas veces no se produce debido al tumor primario sino como consecuencia de la metástasis hacia otros tejidos.

Para que las células de un tumor primario puedan acceder al sistema circulatorio, invadir nuevos tejidos y establecer la metástasis deben ser capaces de digerir la matriz extracelular (MEC) y migrar a través de ella.

La digestión de la MEC está a cargo de una familia de proteinasas llamadas metaloproteinasa de la matriz (MMPs) cuya actividad se encuentra regulada por inhibidores tisulares de MMP (TIMP) que funcionan como inhibidores de proteasas endógenos (Wang, S., 2007).

Los procesos de migración celular se encuentran fuertemente relacionados con las proteínas del citoesqueleto. El citoesqueleto es una red tridimensional dinámica de fibras proteicas que se extiende por el interior de la célula hasta la cara citoplasmática de la membrana plasmática y se encuentra implicado en muchos procesos celulares básicos como son la división celular, la adhesión, la

migración y el transporte intracelular. En las células cancerosas se han reportado tanto cambios en la expresión de las proteínas del citoesqueleto como alteraciones en la reorganización dinámica de las mismas que llevan a favorecer los procesos de metástasis (Sun B y col., 2015).

En los últimos años en nuestro laboratorio estudiamos la isoforma GPAT2 tanto murina (rata y ratón) como humana. Respecto a la isoforma humana, demostramos que el silenciamiento de GPAT2 en células MDA-MB-231 provoca una disminución de la proliferación celular y una mayor sensibilidad a la apoptosis inducida por estaurosporina. También contribuye al fenotipo tumoral al incrementar el crecimiento independiente del anclaje, la movilidad celular y la tumorigénesis *in vivo*. Asimismo, demostramos que la sobreexpresión de GPAT2 en distintas líneas celulares aumenta la tasa de proliferación celular (Pellon Maison M y col., 2014).

Con el objetivo de conocer dichos mecanismos moleculares, realizamos un estudio del perfil de expresión diferencial entre células tumorales MDA-MB-231 que expresan GPAT2 (SCR-MDA) y aquellas con la expresión de GPAT2 silenciada (SH-MDA) mediante un microarreglo de genes, en colaboración con la Plateau



technologique de transcriptomique (GeT - TRiX), de Toulouse, INRA-Toulouse, Francia. Luego del análisis de los resultados encontramos 736 genes diferencialmente expresados, pertenecientes a varias rutas metabólicas y procesos celulares.

En trabajos previos realizados en nuestro grupo de trabajo observamos que el silenciamiento de GPAT2 disminuye la velocidad de migración de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Pellon Maison M y col., 2014) . En particular en este trabajo estamos interesados en comenzar a evaluar los mecanismos moleculares que favorecen esta reducción de la capacidad metastásica.

2. Objetivos

- 1) Estudiar el efecto de la expresión de GPAT2 sobre los procesos de migración e invasión celular de las células silenciadas para GPAT2 (SH-MDA) versus las células sin silenciar (SCR-MDA).
- 2) Evaluar la expresión diferencial de genes relacionados con citoesqueleto y proteínas implicadas en la degradación de la matriz extracelular en ambos tipos celulares.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivo celular

Utilizamos como modelo la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 sin silenciar (SCR-MDA, que expresa GPAT2), y células MDA-MB-231 silenciadas para GPAT2 (SH-MDA, que no expresan GPAT2). Este modelo de silenciamiento se estableció en nuestro laboratorio mediante tecnología de silenciamiento con ARN de interferencia. El plásmido que contiene el silenciador cuenta con fluorescencia GFP y resistencia a puomicina. Las células fueron cultivadas en DMEM (Gibco) 10% SFB (Natocor), 1% estreptomina/penicilina (Gibco) y 1% puomicina (Gibco), 37° C, 5% CO₂.

3.2. Medida de expresión de genes de metaloproteinasas y de proteínas del citoesqueleto utilizando la técnica de qRT-PCR.

Los resultados obtenidos al analizar el microarreglo de genes indicaron que al silenciar GPAT2 los niveles de expresión de las metaloproteinasas MMPs 1, 3 y 9 disminuyen, mientras que con respecto a los correspondientes a las proteínas del citoesqueleto disminuyen la proteína relacionada con actina M1 (AFAP1-L1) y la proteína asociada al filamento de actina 1 like 1 (ARP-M1), y aumentan la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT), la



quinasa de cadena ligera de miosina (MYLK) y la tubulina beta 2B clase IIb (TUBB2B). En este trabajo validamos estos resultados utilizando la técnica de qRT PCR. Para ello aislamos el ARN total de células SCR-MDA y SH-MDA utilizando el reactivo TRIZOL (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuantificamos el ARN obtenido por absorbancia a 260 nm y evaluamos su calidad por electroforesis en gel de agarosa y midiendo la relación de absorbancias a 260/280 y a 260/230. Para realizar la síntesis de ADNc partimos de 1 µg de ARN y empleamos el kit iScript cDNA synthesis Kit (Bio-Rad), y una dilución 1:10 del ADNc obtenido para realizar la qRT-PCR utilizando el kit iTaq Universal Sybr Green Super Mix (Bio-Rad) y los primers específicos correspondientes.

3.3. Ensayo de migración por cierre de herida

En ensayos previos realizados en nuestro grupo habíamos evaluado la capacidad de migración celular de nuestro modelo a tiempos cortos (menores a 8 hs). En este trabajo estamos interesados en validar esos ensayos a tiempos más largos, para así poder relacionarlos con los ensayos de invasión. Para evaluar la capacidad de migración cultivamos las células a

confluencia en DMEM 10% SFB en placas de 48 wells. El día del ensayo lavamos la monocapa con PBS y procedimos a realizar la herida en forma de cruz con una punta de tip amarillo (P200), arrastrándolo por la monocapa con un ángulo aproximado de 30° (no perpendicular). Repetimos el lavado con PBS y agregamos DMEM sin SFB a todos los wells. Se fotografió a tiempo 4 hs, y luego a las 48 hs.

3.4. Ensayo de invasión en spot de agarosa

Para evaluar la capacidad de invasión de nuestras líneas celulares preparamos *spots* de agarosa siguiendo la técnica reportada en bibliografía (Vinader V y col., 2011). Para esto disolvimos agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% en PBS y la colocamos en forma de gotas de 10 µL en placas de 60 mm de diámetro. Dejamos solidificar los spots durante 5 minutos a 4°C, sembramos las placas con 500.000 células SH-MDA o SCR-MDA en DMEM completo y a las 4 hs realizamos un lavado con PBS para eliminar las células no adheridas. Mantuvimos las placas DMEM completo a 37°C, 5% CO₂ durante todo el tiempo del ensayo. Los spots se fotografiaron el día 1 y 5. para determinar la capacidad de invasión de las células en los spots de agarosa.

4. Resultados y discusión

Las células cancerosas con capacidad metastásica expresan y secretan grandes cantidades de MMPs, las cuales degradan la MEC, y esto les permite extravasar, migrar e invadir tejidos distantes.

Para evaluar cómo influye la presencia de GPAT2 sobre

la capacidad metastásica de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 realizamos los ensayos de cierre de la herida (Figura 1A) y de invasión del spot de agarosa (Figura 1B). El ensayo de cierre de la herida es un ensayo simple que permite determinar si las células en estudio tienen la capacidad de migrar desplazándose sobre la herida generada en la monocapa para establecer nuevos contactos célula-célula. El ensayo del spot de agarosa que realizamos es una adaptación de la técnica publicada (Wiggins H y Rappoport J. 2010) dado que nosotros no agregamos ningún quimioatrayente a la gota y solo lo utilizamos como una medida de la capacidad de invasión de las células según expresen o no GPAT2. Como puede observarse en la Figura 1 sólo las células que expresan GPAT2 (SCR-MDA) tienen la capacidad de desplazarse (Figura 1A) e

invadir (Figura 1B), confirmando que las células que expresan GPAT2 tienen un fenotipo tumoral más agresivo.

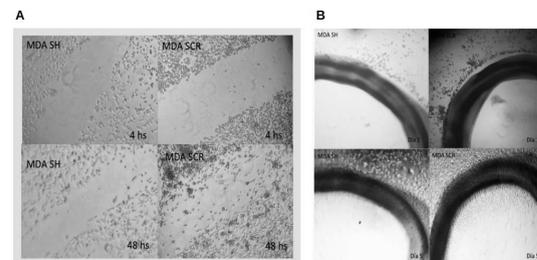


Figura 1 A. Ensayo de cierre de herida, células silenciadas para GPAT2 (MDA SH) vs células sin silenciar (MDA SCR). Fotografías tomadas a las 4 y 48 hs. **B.** Ensayo de spot de agarosa, células silenciadas para GPAT2 (MDA SH) vs células sin silenciar (MDA SCR). Fotografías tomadas a las 4 y 48 hs.

Para comenzar a estudiar los mecanismos moleculares que permitan explicar la relación entre la presencia de GPAT2 y el aumento de la capacidad metastásica decidimos cuantificar tanto la expresión de metaloproteinasas como la de genes relacionados con la reorganización de las proteínas del citoesqueleto.

Las metaloproteinasas son un conjunto de enzimas secretadas por las células cancerosas con capacidad metastásica capaces de degradar la membrana basal y la MEC permitiéndole a estas células extravasar, migrar e invadir tejidos distantes (Gobin E y col., 2019). Como

puede verse en la Figura 2 al silenciar GPAT2 (células SH-MDA) disminuye también la expresión de las metaloproteinasas 1 y 3, lo cual correlaciona de manera directa con la menor capacidad de migración e invasión observada en las células que no expresan GPAT2.

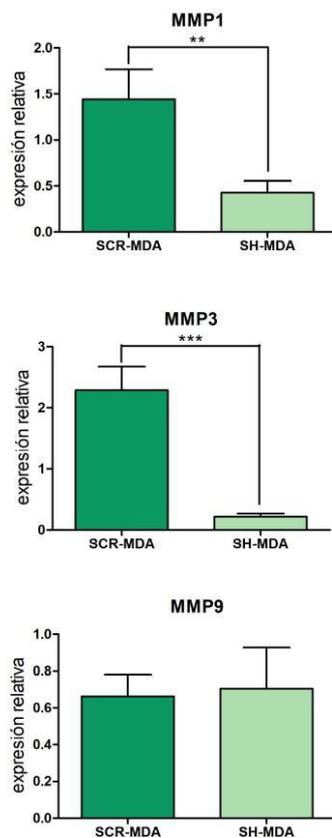


Figura 2. La expresión de metaloproteinasas MMP1, MMP3 aumentó en células silenciadas para GPAT2 (SH-MDA) en comparación con células sin silenciar (SCR-MDA). ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. MMP9 no mostró diferencia significativa.

El citoesqueleto de las células eucariotas está compuesto por 3 tipos de fibras principales, los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios, y por un conjunto de proteínas accesorias encargadas de regular la polimerización y despolimerización de las fibras principales, y las interacciones de estas fibras entre sí y con estructuras intracelulares. El citoesqueleto se encuentra implicado en procesos celulares básicos como son la división celular, la adhesión, la migración y el transporte intracelular. En el cáncer estos procesos se encuentran desregulados y esto favorece la diseminación de las células tumorales iniciando así la metástasis (Aseervatham J. 2020). Como puede observarse en la Figura 3 el silenciamiento de GPAT2 altera la expresión de 5 genes relacionados con la composición (TUBB2B, MAPT) o el remodelado (AFAP1-L1, ARP-M1, MYLK) de las fibras del citoesqueleto.

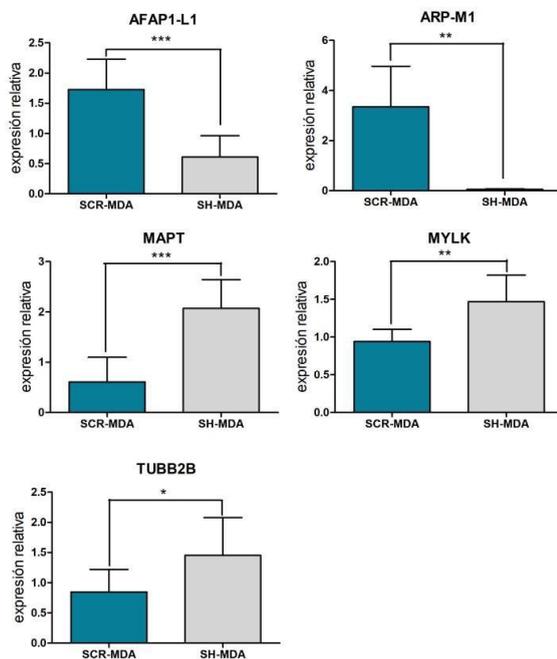


Figura 3. La expresión de genes AFAP1-L1 y ARP-M1 disminuyó en células silenciadas para GPAT2 (SH-MDA) en comparación con células sin silenciar (SCR-MDA), mientras que la expresión de MAPT, MYLK, TUBB2B aumentó. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

Si bien necesitamos realizar más experimentos para comprender en detalle cómo los cambios en la expresión de estos genes afectan a la capacidad metastásica celular, en conjunto estos resultados muestran que el silenciamiento de GPAT2 afecta a la estructura y/o dinámica del citoesqueleto, alterando su función y disminuyendo así la capacidad de migración e invasión celular.

5. Conclusiones.

En este trabajo demostramos que la presencia de GPAT2 en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 correlaciona positivamente con cambios en la expresión de genes que participan de los procesos de migración e invasión celular y le otorga a las células que la expresan un fenotipo tumoral más agresivo.

6. Bibliografía

Aseervatham J. Cytoskeletal Remodeling in Cancer. *Biology (Basel)*. 2020 Nov 7;9(11):385. doi: 10.3390/biology9110385. PMID: 33171868; PMCID: PMC7695181.

Gobin, E., Bagwell, K., Wagner, J. *et al.* A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer* 19, 581 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5768-0>

Pellon-Maison, M., Montanaro, M. A., Lacunza, E., Garcia-Fabiani, M. B., Soler-Gerino, M. C., Cattaneo, E. R., Quiroga, I. Y., Abba, M. C., Coleman, R. A. and Gonzalez-Baro, M. R. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 behaves as a cancer testis gene and promotes growth and tumorigenicity in the



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

breast cancer MDA-MB-231 cell line.
PLoS. One. **9**, e100896. 2014

Sun BO, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J.
Role of cellular cytoskeleton in
epithelial-mesenchymal transition process
during cancer progression. Biomed Rep.
2015 Sep;3(5):603-610. doi:
10.3892/br.2015.494. Epub 2015 Jul 27.
PMID: 26405532; PMCID: PMC4576489.

Vinader Victoria , Yousef Al-Sarairah ,
Helen L. Wiggins , Joshua Z. Rappoport ,
Steve D. Shnyder , Laurence H. Patterson
, Kamyar Afarinkia
An agarose spot
chemotaxis assay for chemokine receptor
antagonists. 2011

Wiggins H, Rappoport J. An agarose spot
assay for chemotactic invasion.
Biotechniques. 2010;48(2):121-4. doi:
10.2144/000113353. PMID: 20359295.

7. Financiamiento

Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Tecnológicas (CONICET)
Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.
Instituto de Investigaciones Bioquímicas
de La Plata, “Profesor Doctor Rodolfo R
Brenner” (INIBIOLP)

8. Agradecimientos

Agradezco a mis directores, Dra. Maria
González Baró y Dr. Mauro Montanaro,
por su apoyo y contribuciones.