



## D.36. Salud Humana

### **Rol de GPAT2 en la inhibición de la apoptosis inducida por el ácido araquidónico en un modelo de cáncer de mama.**

**Autora:** Ferremi, Fiorella; [fioferremi1@gmail.com](mailto:fioferremi1@gmail.com)

**Co-autores:** Moscoso, Verónica; [veronica.vmoscoso@gmail.com](mailto:veronica.vmoscoso@gmail.com);

Dominguez Muller, Haiko; [haikodmuller@gmail.com](mailto:haikodmuller@gmail.com);

**Profesora guía:** Cattaneo, Elizabeth; [elizabethcattaneo@gmail.com](mailto:elizabethcattaneo@gmail.com)

**Facultad de Ciencias Médicas**  
**Universidad Nacional de La Plata**

---

## 1. Resumen

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente, con más de 2,2 millones de casos en 2020, y es la principal causa de muerte en las mujeres ([who.int](http://who.int)).

Las células tumorales hacen uso de diversos mecanismos que les permiten adquirir su capacidad distintiva de dividirse sin control, uno de ellos es la evasión de la apoptosis. En cada tipo de cáncer esta evasión de la apoptosis puede ocurrir por distintas vías, pero en particular, en varios modelos de cáncer de mama, colon e hígado, se ha demostrado que la evasión de la apoptosis se encuentra asociada a la sobreexpresión de enzimas capaces de metabolizar el ácido araquidónico (AA).

El AA y los productos formados durante su metabolismo (eicosanoides) son críticos para el proceso de carcinogénesis debido a que el AA libre intracelular es un fuerte inductor de la apoptosis, y por lo tanto las vías metabólicas que disminuyen los niveles de AA libre pueden impedir este mecanismo de muerte celular.

En nuestro laboratorio estudiamos la glicerol-3-fosfato aciltransferasa 2 (GPAT2), una enzima que presenta altos niveles de expresión en modelos de cáncer de mama y colon en los cuales contribuye de forma positiva al desarrollo de ciertas características tumorales esenciales, como son el aumento de la proliferación y la migración celular.

GPAT2 también participa del metabolismo del AA y en este trabajo demostramos que su expresión es necesaria para evitar la muerte celular por apoptosis inducida por el agregado de AA exógeno en las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231.

**Palabras clave:** Apoptosis, GPAT2, Ácido Araquidónico

## 2. Introducción

Cada año en América más de 462.000 mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama, y casi 100.000 mueren a causa de esta enfermedad. Si las tendencias actuales continúan se prevé que para el año 2030 el número de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama aumente en un 34% ([OPS](#))

En particular en la Argentina, según las estimaciones de incidencia del Observatorio Global de Cáncer de la OMS, el cáncer de mama es el de mayor magnitud en cuanto a ocurrencia, con un registro de más de 22.000 casos al año para el año 2020, lo cual representa el 32,1% de los cánceres femeninos ([IARC Argentina](#)).

En nuestro laboratorio analizamos el perfil de expresión de GPAT2 mediante inmunohistoquímica en muestras de carcinomas de mama humanos y demostramos que la expresión de GPAT2 correlaciona significativamente con el grado histológico de los carcinomas,

siendo mayor en los carcinomas menos diferenciados (Pellon-Maison M y col., 2014).

Teniendo en cuenta la importancia y prevalencia de esta patología, tanto a nivel mundial como en la Argentina, una de nuestras líneas de trabajo principales consiste en determinar el rol desempeñado por GPAT2 en la promoción del fenotipo tumoral.

Las enzimas GPATs catalizan la esterificación de los acil-CoAs al glicerol-3-fosfato durante el primer paso de la síntesis de glicerolípidos. Hasta el momento en mamíferos se han identificado 4 isoformas de GPATs (GPAT1-4). Las isoformas GPAT1, 3 y 4 se expresan en órganos lipogénicos, como el hígado o el tejido adiposo y utilizan como sustratos acil-CoAs saturados o monoinsaturados. En cambio, GPAT2 presenta 2 características que la diferencian de las otras 3 isoformas: por un lado, tiene un perfil de expresión diferente, detectándose en células de la línea germinal masculina en condiciones



fisiológicas (Cattáneo ER y col., 2012), y en ciertos tipos de tumores en condiciones patológicas (Pellon-Maison M y col., 2014). Y por otro lado, es la única isoforma de GPAT que utiliza como sustrato un ácido graso poliinsaturado, el AA (Cattáneo ER y col., 2012).

Estas características distintivas sugieren un rol diferente para GPAT2, el cual podría estar relacionado con el alto grado de proliferación y/o supervivencia celular que presentan los tejidos que la expresan en un nivel elevado (células de la línea espermática y ciertos tumores).

El AA y los productos formados durante su metabolismo (eicosanoides) son críticos para el proceso de carcinogénesis, y el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por su sigla en inglés) ha determinado a las vías del metabolismo del AA como áreas prioritarias para la investigación en la prevención del cáncer (Greenwald P. 2002). Esto es debido a que el AA libre intracelular es un fuerte inductor de la apoptosis, y por lo tanto las vías metabólicas que disminuyen los niveles de AA libre pueden impedir este mecanismo de muerte celular (Monjabez AM y col., 2005; Monjabez AM y col., 2006).

En las células, el AA puede ser metabolizado principalmente hacia dos destinos: uno es la síntesis de eicosanoides, proceso catalizado por enzimas de las familias de las ciclooxigenasas (COX), las lipooxigenasas (LOX) y de las citocromo P450. El otro destino es la síntesis y remodelado de glicerolípidos, del cual participan enzimas de la familia de las ACSL (acil-CoA sintetasas de cadena larga) activando los ácidos grasos hacia acil-CoAs, GPAT2 y distintas isoformas de AGPAT esterificando los acil-CoAs al glicerol-3-P, y las enzimas remodeladoras de fosfolípidos CoA-IT (Transacilasas independientes de CoA).

Una de las principales características de las células tumorales es su capacidad de desarrollar mecanismos para evadir la apoptosis, lo cual constituye uno de los sellos del cáncer (Hannahan y Weinberg, 2000), y es debido a esto que la relación entre la expresión de estas enzimas y el desarrollo del cáncer ha sido ampliamente estudiada.

En este sentido se ha demostrado que las enzimas COX y LOX se encuentran sobreexpresadas en distintos tipos de tumores, y que los inhibidores de estas enzimas poseen efectos



anticarcinogénicos *in vivo*, e inducen apoptosis en muchas líneas celulares de cáncer *in vitro*. Esto ha llevado a varios grupos de trabajo a estudiar inhibidores de esta vía metabólica por sus potenciales efectos antitumorales (Monjazez AM y col., 2005).

Por otro lado, en modelos de cáncer de mama, hígado y colon también se ha observado un aumento de expresión de la enzima FACL4 (isoforma implicada específicamente en la activación del AA) y de las CoA-IT, y que el bloqueo de estas enzimas conduce a un aumento de la apoptosis (Monjazez AM y col., 2005; Sung YK y col., 2003; Cao Y y col., 2001; Hu C y col., 2008; Maloberti PM., 2010; Dattilo MA y col., 2019).

En conjunto, estos resultados nos indican que el control del nivel de AA libre intracelular es crítico para la supervivencia de las células cancerosas, y dado que GPAT2 también está implicada en el metabolismo de este ácido graso determinar su rol en las células tumorales es de suma importancia para dilucidar los mecanismos moleculares que relacionan al AA con el proceso tumorigénico.

### 3. Objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos específicos del presente trabajo son:

- 1) Evaluar los cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del AA que ocurren como consecuencia del silenciamiento de GPAT2 en un modelo de cáncer de mama.
- 2) Estudiar el efecto de la expresión de GPAT2 sobre las vías de activación de la apoptosis inducidas por el tratamiento con AA.

### 4. Materiales y métodos

*Modelo de trabajo:* utilizamos como modelo la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 de tipo salvaje (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 (Pellón-Maison y col., 2014).

*Estudio de la expresión diferencial de genes relacionados al metabolismo del AA:* resultados previos obtenidos a partir de un microarreglo de genes nos permitieron observar que al silenciar



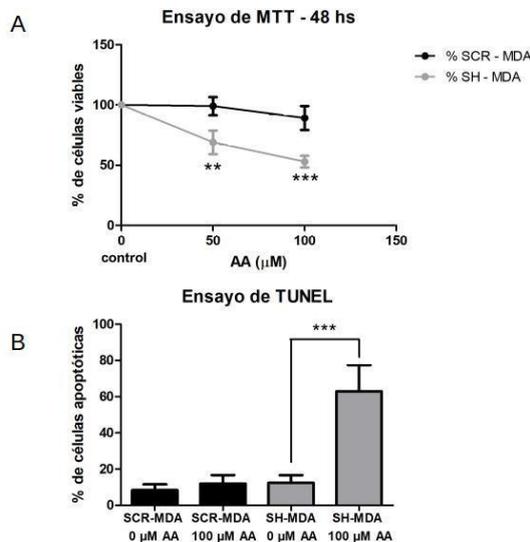
GPAT2 aumenta la expresión de otros 3 genes: AKR1C3, ALOX5, y EPHX2, implicados en el metabolismo del AA. En este trabajo verificamos este resultado utilizando la técnica de qRT-PCR. Para ello aislamos el ARN total de células SCR-MDA y SH-MDA utilizando el reactivo TRIZOL (Life Technologies) siguiendo 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. Finalmente utilizamos 1 µg de ARN para realizar la síntesis de ADNc empleando 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.

*Análisis de la influencia de GPAT2 sobre los mecanismos de apoptosis inducidos por el AA:* para determinar el mecanismo por el cual se activa la apoptosis en nuestro modelo celular medimos la actividad de diferentes caspasas utilizando un kit colorimétrico comercial. Para ello incubamos las células SH-MDA con AA 100 µM por 48 hs y utilizamos el

ab102486 Caspase Substrate Kit (Colorimetric) de Abcam, el cual provee los sustratos para medir la actividad de 7 caspasas diferentes, incluyendo la caspasa 9 (iniciadora de la vía intrínseca) y la caspasa 8 (iniciadora de la vía extrínseca).

## 5. Resultados y discusión

En trabajos previos realizados en nuestro grupo evaluamos los efectos producidos sobre la supervivencia celular (técnica de MTT) y la muerte celular por apoptosis (técnica de TUNEL) al tratar las líneas celulares SCR-MDA y SH-MDA con 100 µM de AA por 48 hs. Como puede observarse en la Figura 1 el tratamiento con AA disminuye significativamente la supervivencia celular (Fig. 1A) y aumenta significativamente la muerte celular por apoptosis (Fig. 1B) sólo de las células que no expresan GPAT2 (SH-MDA). Además, como puede verse en la Figura 1B, en ausencia de AA los niveles de apoptosis detectados son bajos y no hay diferencias entre ambas líneas celulares.



**Figura 1.** Efecto del tratamiento con AA 100  $\mu\text{M}$  durante 48 hs sobre la supervivencia celular (1A) y sobre la muerte celular por apoptosis (1B) de células que expresan (SCR-MDA) o que no expresan (SH-MDA) GPAT2. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Esto nos llevó a preguntarnos por un lado, si al silenciar GPAT2 se inducía la expresión de otras enzimas capaces de participar del metabolismo del AA, y por otro, cuál era la vía apoptótica activada por el AA en ausencia de GPAT2.

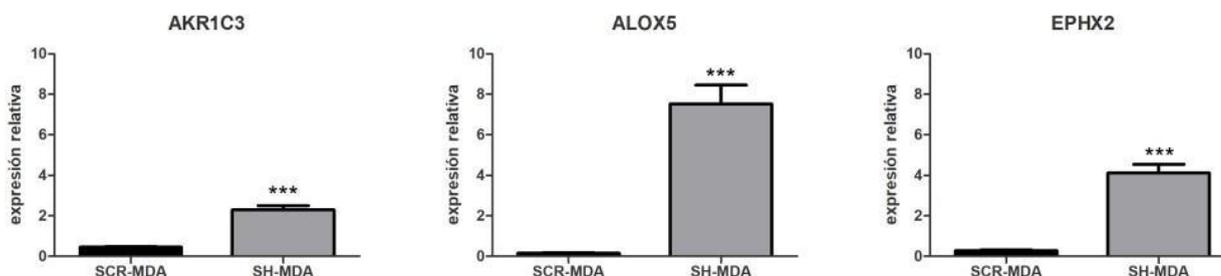
Para contestar la primera pregunta cuantificamos por qRT-PCR los niveles de ARNm de 3 enzimas implicadas en el metabolismo del AA: AKR1C3, ALOX5 y

EPHX2, y como puede verse en la Figura 2 las células SH-MDA compensan la falta de GPAT2 sobreexpresando otras 3 enzimas que participan del metabolismo del AA.

AKR1C3 participa en la transformación de las prostaglandinas derivadas del AA, y en varios modelos de cáncer se la encuentra asociada al control del crecimiento y la diferenciación celular (Desmond JC y col., 2003).

ALOX5 participa de la transformación del AA en leucotrienos, es la enzima que en nuestro modelo presenta el mayor nivel de cambio, y ha sido implicada en diferentes mecanismos de muerte celular, incluyendo la apoptosis (Qian-Yi S y col., 2019).

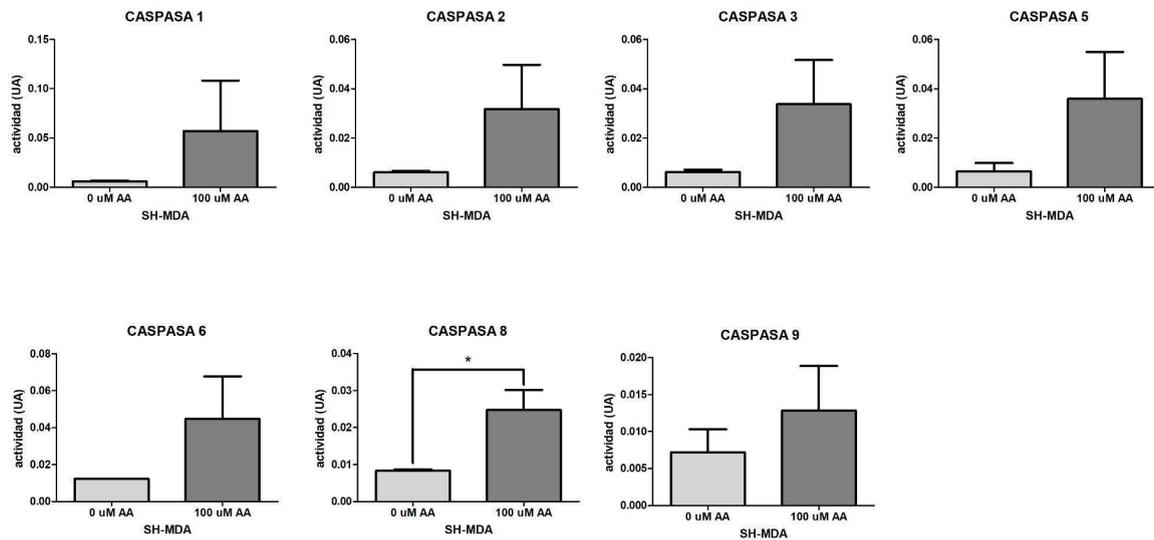
EPHX2 promueve la transformación de los eicosanoides derivados del metabolismo del AA en metabolitos menos activos, y su expresión se encontró desregulada en varios tipos de tumores (Liu MS y col., 2021).



**Figura 2.** El silenciamiento de GPAT2 aumenta la expresión de otros genes que codifican para enzimas que metabolizan el AA. La expresión de AKR1C3, ALOX5 y EPHX2 se cuantificó utilizando la técnica de q-RT-PCR. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Para contestar la segunda pregunta incubamos las células SH-MDA durante 48 hs con 100  $\mu$ M de AA y medimos la actividad de diferentes caspasas. Como puede observarse en la Figura 3, el tratamiento con AA aumenta la actividad de todas las caspasas evaluadas, siendo este resultado significativo, en particular,

para la caspasa 8. Este experimento lo realizamos sólo con las células SH-MDA porque por la técnica de TUNEL ya habíamos observado que el AA no activa la muerte celular por apoptosis en las células SCR-MDA.



**Figura 3.** El tratamiento con AA aumenta la actividad de las caspasas en células SH-MDA. Las células SH-MDA fueron tratadas con AA 100  $\mu$ M durante 48 hs y para medir la actividad de las caspasas se utilizó un kit colorimétrico comercial. \*  $p < 0.05$

El AA de por sí, así como también los productos derivados de su metabolismo, ejerce sus efectos tanto sobre los procesos de proliferación como de muerte celular, y es por esto que los niveles de estos metabolitos, así como los de las enzimas que los producen, se encuentran bajo un estricto control dentro de las células (Maloberti PM y col. 2010).

GPAT2 utiliza como sustrato AA (Cattaneo ER y col. 2012) y su expresión está asociada a un aumento de varias características tumorales como son la proliferación y migración celular, la

capacidad tumorigénica en animales, y el grado histológico en tumores humanos (Pellon Maison y col. 2014). Los resultados presentados en este trabajo nos permiten demostrar que el silenciamiento de GPAT2 conduce a un cambio en la expresión de genes implicados en el metabolismo del AA.

Así, en condiciones basales, las células SH-MDA compensan la falta de GPAT2 sobreexpresando otras enzimas capaces de metabolizar este ácido graso. Sin embargo, frente a una sobrecarga de AA exógeno estas enzimas no son capaces de metabolizarlo, lo que lleva a las células



SH-MDA a la muerte celular por apoptosis.

El o los mecanismos por los cuales ocurre la apoptosis desencadenada por el AA aún no están claros. Algunos autores han reportado aumentos en la actividad de la caspasa 3 intermediaria tanto de la vía intrínseca como de la extrínseca, de la caspasa 8 intermediaria de la vía extrínseca, así como también aumentos en la expresión de diferentes proteínas involucradas en estos mecanismos como son FAS, y miembros de la familia Bcl2 (Cao Y y col., 2000; Polavarapu S y col., 2018).

En nuestro modelo de trabajo pudimos demostrar que GPAT2 es necesaria para evitar la muerte celular por apoptosis inducida por el AA, y que en su ausencia (células SH-MDA) el AA produce un aumento en la actividad de las caspasas correspondientes tanto a la vía intrínseca como a la vía extrínseca, por lo que planeamos realizar otros ensayos para poder dilucidar con más detalle este mecanismo.

## **6. Conclusión.**

En conclusión, proponemos que GPAT2 es el producto de un gen pro-tumorígeno

que actúa disminuyendo los niveles de AA libre intracelulares y por lo tanto su capacidad de inducir apoptosis, contribuyendo así a un aumento de las características tumorales.

## **7. Bibliografía.**

Cao Y, Dave KB, Doan TP, Prescott SM. Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1;61(23):8429-34. 2001.

Cattaneo ER, Prieto ED, Garcia-Fabiani MB, Montanaro MA, Guillou H, Gonzalez-Baro MR. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 expression modulates cell roughness and membrane permeability: An atomic force microscopy study. *PLoS One.* 12(12):e0189031. doi:10.1371/journal.pone.0189031. 2017.

Dattilo MA, Benzo Y, Herrera LM, Prada JG, Castillo AF, Orlando UD, Podesta EJ, Maloberti PM. Regulatory mechanisms leading to differential Acyl-CoA synthetase 4 expression in breast cancer cells. *Sci Rep.* 2019 Jul 16;9(1):10324. doi: 10.1038/s41598-019-46776-7. PMID: 31311992; PMCID: PMC6635356. 2019

Desmond JC, Mountford JC, Drayson MT, Walker EA, Hewison M, Ride JP, Luong QT, Hayden RE, Vanin EF, Bunce CM. The



Aldo-Keto Reductase AKR1C3 Is a Novel Suppressor of Cell Differentiation That Provides a Plausible Target for the Non-Cyclooxygenase-dependent Antineoplastic Actions of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs<sup>1</sup>. *Cancer Res* 15 January 2003; 63 (2): 505–512.

Garcia-Fabiani MB, Montanaro MA, Stringa P, Lacunza E, Cattaneo ER, Santana M, Pellon-Maison M, Gonzalez-Baro MR. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 is essential for normal spermatogenesis. *Biochemical Journal*. 474 (18) 3093-3107; DOI: 10.1042/BCJ20161018. 2017.

Greenwald P. Cancer prevention clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 20. 14S–22S. 2002.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931. 2000

Hu C, Chen L, Jiang Y, Li Y, Wang S. The effect of fatty acid-CoA ligase 4 on the growth of hepatic cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 7(1):131-4. 2008.

Liu MS, Zhao H, Xu CX, Xie PB, Wang W, Yang YY, Lee WH, Jin Y, Zhou HQ. Clinical significance of EPHX2 deregulation in

prostate cancer. *Asian J Androl* 2021;23:109-15.

Maloberti PM, Duarte AB, Orlando UD, Pasqualini ME, Solano ÁR, López-Otín C, et al. Functional Interaction between Acyl-CoA Synthetase 4, Lipooxygenases and Cyclooxygenase-2 in the Aggressive Phenotype of Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 5(11): e15540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015540>. 2010

Monjazez AM, High KP, Koumenis C, Chilton FH. Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73(6):463-74. 2005.

Monjazez AM, High KP, Connoy A, Hart LS, Koumenis C, Chilton FH. Arachidonic acid-induced gene expression in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 27(10):1950-60. 2006.

Pellon-Maison M, Cattáneo ER, Rabassa ME, Lacunza E, Coleman RA, y Gonzalez-Baro MR. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 is expressed in spermatogenic germ cells and incorporates arachidonic acid into triacylglycerols. *PLoS One.* 7:8, e42986. 2012.



**“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

Pellon-Maison M, Montanaro MA, Lacunza E, Garcia-Fabiani MB, Soler-Gerino MC, Cattaneo ER, Quiroga IY, Abba MC, Coleman RA, y Gonzalez-Baro MR. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 behaves as a cancer testis gene and promotes growth and tumorigenicity of the breast cancer MDA-MB-231 cell line. PLoS One. 26:9 (6):e100896. 2014.

Polavarapu S y col. Arachidonic acid activates extrinsic apoptotic pathway to enhance tumoricidal action of bleomycin against IMR-32 cells. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA) 2018.

Qian-Yi Sun, Hong-Hao Zhou, Xiao-Yuan Mao. Emerging Roles of 5-Lipoxygenase

Phosphorylation in Inflammation and Cell Death. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, doi.org/10.1155/2019/2749173. 2019.

Sung YK, Hwang SY, Park MK, Bae HI, Kim WH, Kim JC, Kim M. Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. 94(5):421-4. 2003.