



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

Tesis para optar al título de Licenciado en Bioquímica

*ESTUDIO DE UN MODELO CELULAR DE TRANSICIÓN EPITELIO
MESENQUIMAL DE CÁNCER MAMARIO*

MARCOS DAVYT BORTHAGARAY

Dra. MÓNICA MARÍN

Lic. TAMARA FERNÁNDEZ

Montevideo, Uruguay

2018

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que de alguna forma han contribuido en mi proceso de formación y en el cierre de esta etapa que culmina en este trabajo. Particularmente quisiera expresar mis agradecimientos,

A Mario, Cora y Ricardo por siempre guiarme y ayudarme con el trabajo en el laboratorio, por aportarme sugerencias para la escritura de la tesina y especialmente por las discusiones de las tardes de las que tanto he aprendido.

A Karen por enseñarme a trabajar en “cultivo”, por su disposición para ayudarme siempre que tenía alguna duda en el Pasteur (bastante frecuente por cierto) y más que nada por siempre estar atenta cuando me mandaba alguna macana con las células y de alguna forma tratar de arreglarla.

A Mariela, por permitirme realizar la pasantía en su unidad y por involucrarse en este trabajo aportando ideas siempre que nos juntamos a discutir los resultados.

A todos los integrantes de la Sección Bioquímica por la buena onda y disposición para ayudar en todo momento.

A mis amigos de la vida y a los de la facultad por todos los momentos vividos juntos y las juntadas a estudiar o escribir.

A mis padres, mi hermano, mis abuelos que me regalaron mi primer libro de bioquímica y a toda mi familia por siempre apoyarme y alentarme.

A Lucía por su amor y su paciencia; por siempre encontrar una salida cuando estoy a punto de ahogarme en un vaso de agua.

A Tamara por ofrecerse a codirigir mi tesina, por dedicarme de su tiempo, estando siempre dispuesta a sacarme las dudas sobre las células y los distintos experimentos; y por todos sus consejos y opiniones para la escritura de la tesina.

A Mónica muy especialmente, por enseñarme y orientarme en todo este proceso, por permitirme formar parte de este grupo y llevar a cabo este trabajo en su laboratorio, por las oportunidades que me ha brindado, por ser siempre optimista cuando las cosas no salían y por releer la tesina todas las veces que fue necesario.

A Ana Denicola por disponer de su tiempo para evaluar la tesina.

A las agencias financiadoras e instituciones que me permitieron llevar a cabo este trabajo: Facultad de Ciencias, Instituto Pasteur de Montevideo y la ANII

RESUMEN

El receptor de estrógenos alfa (ER α) media los efectos pleiotrópicos y tejido-específicos de estas hormonas sobre el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de diversos tejidos. El ER α juega también un rol muy importante en el tratamiento del cáncer de mama de respuesta hormonal y en el tratamiento de la osteoporosis. Los tumores de mama ER α positivos tienen mejor pronóstico y pueden ser controlados eficientemente por fármacos. Sin embargo, a veces las células cambian, sufren una transición epitelio-mesenquimal (TEM) y el tumor se vuelve resistente a la terapia. En ese proceso las células epiteliales pierden su polaridad, la adhesión célula-célula y junto a otros cambios adquieren motilidad, pudiendo migrar y formar metástasis en sitios distantes.

En este contexto, una línea de investigación de nuestro laboratorio busca comprender los cambios que se producen en la actividad del ER α durante la transición epitelio-mesenquimal de cáncer mamario que puedan ayudar a explicar la aparición de la resistencia al tratamiento.

Para abordar dicha investigación, se cuenta con un modelo celular de transición epitelio-mesenquimal basado en tres líneas celulares derivadas de MCF7, que contienen distintas variantes del gen MKL1, cuya expresión es inducible por tetraciclina. Las líneas llamadas MCF7-ZB, MCF7-D+, y MCF7-D-, luego del tratamiento con tetraciclina, adquieren un fenotipo que corresponde a las células antes de la TEM, luego de la TEM y luego de una transición inversa o transición mesenquimo-epitelial (TME), respectivamente. Empleando este sistema celular, esta línea de investigación busca caracterizar los principales componentes de la maquinaria traduccional, en paralelo con las propiedades funcionales del ER α y se espera establecer si variaciones en los componentes de la

maquinaria traduccional están asociadas con diferencias conformacionales y funcionales del ER α durante la TEM de cáncer mamario, llevando al escape del control hormonal y a la resistencia al tratamiento.

Por tal motivo, en este estudio concretamente, nos propusimos profundizar en la comprensión de dicho modelo a través de estudios metabólicos de las líneas celulares que lo constituyen y estudios funcionales del ER α endógeno de dichas líneas, en distintas condiciones.

De esta forma, logramos poner a punto un método que permite identificar las tres líneas celulares de forma rápida, a través de un western blot. El análisis de las curvas de crecimiento mostró que las tres líneas crecen de forma relativamente pareja, sin embargo, una vez inducidas con tetraciclina, la línea D+ presenta un descenso drástico en su viabilidad, probablemente asociado al estrés sufrido durante la TEM. En paralelo, las medidas de glucosa y lactato, arrojaron resultados alentadores concordantes con otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio mediante ribosome profiling, mostrando que la línea D+ presenta un metabolismo más acelerado respecto las otras dos líneas. Por último, en este contexto de la TEM, analizamos la actividad del ER α mediante ensayos de transactivación a través de genes reporteros. Estos ensayos mostraron una reducción importante de la actividad del ER α en la línea D+ respecto a la ZB, en parte explicado por un descenso en su expresión, demostrado mediante western blot. Estos resultados concuerdan con lo descrito en la bibliografía acerca de los procesos de TEM en cáncer de mama.

PALABRAS CLAVE – *Receptor de estrógenos alfa (humano) - ER α - Cáncer de mama - Transición epitelio-mesenquimal - Transición MKL1-dependiente - MCF7*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Contexto de la investigación	8
1.2. Receptor de estrógenos α (ER α).....	9
a) <i>Estructura del ERα</i>	10
b) <i>Mecanismos de regulación</i>	12
c) <i>Bases moleculares de la respuesta tejido-específica de los ERs</i>	16
1.3. Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM).....	17
a) <i>Marcadores característicos de la TEM en cáncer de mama</i>	21
b) <i>Regulación de la inducción / inhibición de la TEM</i>	22
1.4. Vía de señalización MKL1/actina	24
1.5. Objetivos	30
2. MATERIALES	31
2.1. Líneas celulares	31
2.2. Medios de cultivo para las líneas celulares	32
a) <i>Medio de mantenimiento</i>	32
b) <i>Medio de inducción/transfección</i>	32
2.3. Vectores	32
2.4. Anticuerpos	33
3. MÉTODOS	34
3.1. Condiciones de cultivo de las líneas celulares para los distintos ensayos.....	34
a) <i>Condiciones de mantenimiento</i>	34
b) <i>Curva de crecimiento, consumo de glucosa / producción de lactato</i>	34
c) <i>Determinación de la actividad transcripcional del ERα endógeno</i>	36
3.2. Verificación de la identidad de las tres líneas celulares	38
3.3. Medidas de glucosa y lactato en los sobrenadantes del cultivo y curva de crecimiento	39
3.4. Cultivo de bacterias, preparación de células competentes y transformación	40
<i>Preparación de células competentes y su transformación</i>	40

3.5. Purificación del ADN plasmídico, cuantificación y control de calidad.....	42
3.6. Determinación de la actividad transcripcional del ER α mediante genes reporteros	42
3.7. Western Blot.....	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1. Puesta a punto del cultivo de las tres líneas celulares	47
4.2. Verificación de la identidad de las tres líneas celulares	49
4.3. Curvas de crecimiento celular	52
4.4. Determinación del consumo de glucosa y producción de lactato..	54
4.5. Efecto de la concentración de ligando en la eficiencia de transactivación del ER α endógeno en las tres líneas celulares	62
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	67
6. REFERENCIAS	70
7. ANEXO	77
7.1. Resultados preliminares obtenidos por Ribosome Profiling	77
7.2. Soluciones.....	79
7.3. Marcadores de peso molecular	82
a) <i>Marcadores de peso molecular para ADN</i>	82
b) <i>Marcadores de peso molecular para proteínas</i>	82
7.4. Vectores	83

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contexto de la investigación

Los estrógenos (especialmente 17- β -estradiol o E2) son hormonas que presentan una diversidad de funciones muy variada, por ejemplo, regulan el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de distintos tejidos ¹. Desde hace varios años, se conoce que los efectos pleiotrópicos y tejido-específico de estas hormonas son mediados principalmente por los receptores de estrógenos α y β (ER α y ER β respectivamente), habiendo sido éste descrito más recientemente ². Estos receptores actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de distintos genes en respuesta al E2. En la actualidad, se considera que el ER α tiene un rol relevante tanto en la vida celular normal como en diversos procesos patológicos, por ejemplo, en el cáncer mamario ¹. Aproximadamente el 70% de los cánceres de mama expresan ER α (son ER α positivo o ER α +), mediante el cual los estrógenos promueven la proliferación celular ³. En general, los tumores ER α + son diferenciados y menos invasivos que los ER α negativos (ER α -) y en ellos la proliferación de las células puede ser inhibida por fármacos antiestrogénicos como los denominados “SERMs” (“Selective Estrogen Receptor Modulators”) ⁴. Estos fármacos son ligandos del receptor y pueden regular su actividad, actuando como agonistas o antagonistas dependiendo del tejido. Sin embargo, con el tiempo, tumores ER α + pueden convertirse en ER α -. Las células que sufren estos cambios se vuelven resistentes a la terapia hormonal y cambian de un fenotipo epitelial diferenciado a uno mesenquimal (desdiferenciado) resultando en un proceso de metástasis. Este cambio es conocido como transición epitelio mesenquimal ⁵. Las células resistentes a la terapia hormonal presentan una reducción de la actividad y/o de expresión del ER α y un aumento en la actividad de receptores de factores de crecimiento.

Una línea de investigación de nuestro laboratorio busca comprender los cambios que se producen en la célula tumoral durante la TEM y que llevan a la pérdida de la respuesta hormonal y a la resistencia al tratamiento. Además se propone establecer si existen diferencias en las propiedades funcionales y en la conformación del ER durante la TEM que pudieran estar asociadas a cambios en su biosíntesis y plegamiento.

1.2. Receptor de estrógenos α (ER α)

Los receptores de estrógenos (ER) son factores de transcripción que median los efectos de estas hormonas, regulando la expresión de ciertos genes en distintos tejidos. Aunque los estrógenos son clásicamente vistos como hormonas exclusivamente reproductivas, en los mamíferos sin embargo, inducen cambios celulares en casi todos los tejidos ⁶. Debido al importante rol de los estrógenos en fisiología y fisiopatología, no es sorprendente que estas hormonas estén implicadas en el desarrollo o progresión de enfermedades como el cáncer (mamario, de endometrio y ovarios), endometriosis, osteoporosis, obesidad, así como enfermedades cardiovasculares, autoinmunes y neurodegenerativas ⁷. A su vez, el ER α es de especial interés debido a que se encuentran en altos niveles en la gran mayoría de los cánceres mamaros ⁴, siendo muy utilizado como un factor para el pronóstico de esta enfermedad ⁸. En consecuencia, la inhibición del ER α se ha convertido en una de las principales estrategias para la prevención y el tratamiento del cáncer de mama.

Estos receptores forman parte de la superfamilia de los receptores nucleares para hormonas esteroideas (NR), entre los que se encuentran los receptores de andrógenos, progestágenos y glucocorticoides, entre otros ⁹. Estos receptores se localizan principalmente en el citoplasma y en

el núcleo celular en forma soluble, o asociados a la membrana plasmática, lo que les permite abarcar un amplio rango de funciones ⁶.

Más recientemente se describió un segundo subtipo de receptor de estrógenos llamado ER β . Este receptor posee una estructura y actividad similar pero no idéntica al ER α , y su importancia en el cáncer de mama, si la hubiera, es aún poco comprendida ^{2,10}.

a) Estructura del ER α

El ARNm del ER α wt está compuesto por 8 exones codificantes ¹¹ y es traducido a una proteína de 595 aminoácidos, pudiendo presentar a su vez varias isoformas, siendo la de 66 kDa la más abundante.

En 1986, Krust y colaboradores propusieron, mediante alineamientos de secuencias aminoacídicas de receptores nucleares, que los miembros de esta familia de factores de transcripción compartían una organización modular conformada por seis dominios nombrados de “A” a “F” ¹² (figura 1).

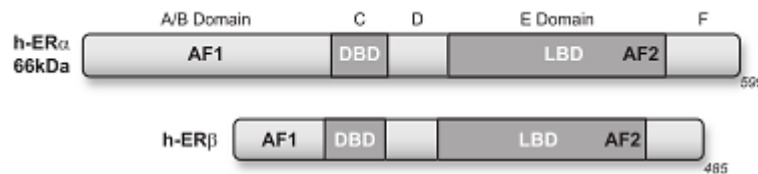


Figura 1. Dominios funcionales del ER α y ER β

Se representan los distintos dominios de los ERs humanos y sus funciones. A-F1, A-F2: dominios de transactivación 1 y 2; DBD: dominio de unión al ADN; LBD: dominio de unión al ligando. Modificada de *Arnal et al., 2017 (1)*.

El dominio N-terminal de los receptores nucleares, denominado A/B, es altamente variable tanto en la secuencia primaria como en su longitud. En el ER α el dominio B presenta una región con función de transactivación conocida como AF-1. Esta función de transactivación se caracteriza por ser

independiente del ligando, de acuerdo a lo que se describe en *Lees, Fawell, & Parker, 1989* donde demostraron que el mismo presenta una actividad transcripcional constitutiva al estudiar este dominio aislado del resto de la proteína (por lo tanto carente del dominio de unión al ligando). Estos dominios también presenta un papel importante en la estabilización del receptor cuando se une al ADN y en la eficiencia de dimerización ¹⁴.

En la región central se encuentran los dominios C y D. El dominio C es el más conservado entre los NR y constituye el dominio de unión al ADN (DBD) ¹⁵. La estructura cristalográfica de este dominio demostró que esta región presenta una estructura globular compacta formada por dos dedos de zinc. Cada uno formado por cuatro residuos de cisteína coordinando un ion de zinc. Estos dominios se unen principalmente a secuencias en el ADN denominadas “elementos de respuesta a estrógenos” (ERE) que consisten en secuencias consenso de 13 pb de la siguiente forma: 5´-GGTCAnnnTGACC-3´. Este motivo palindrómico permite la unión del receptor en forma dimérica al ADN ¹⁶. Por su parte, el dominio D consiste en una región “bisagra” entre los dominios C y E. Está involucrado en los cambios conformacionales del ER α cuando éste se une al ADN o a su ligando y en las interacciones proteína-proteína cuando forma homo o heterodímeros. A su vez, contiene señales de localización nuclear (NLS), importantes para la translocación del receptor del citoplasma al núcleo ¹⁷. El dominio D también es importante en la interacción del receptor con otros factores de transcripción y está sujeto a diversas modificaciones postraduccionales que modulan la actividad del receptor, incluyendo eventos de fosforilación, acetilación y metilación.

El dominio E es una región relativamente extensa de los NR, estructural y funcionalmente compleja, donde se ubica el dominio de unión al ligando (LBD). Esta región es muy conservada entre los receptores de un mismo

ligando. Estudios realizados por cristalografía de proteínas mostraron que el dominio E del ER α presenta 12 α -hélices (H1 a H12) y dos láminas β formando un bolsillo hidrofóbico donde se acomoda el ligando (figura 2) ¹⁸. Estudios estructurales realizados a partir de varios NR demostraron que la organización tridimensional de este dominio sufre un fuerte reordenamiento luego la unión al ligando. A su vez, este dominio incluye la interfaz que permite la dimerización del receptor y un segundo sitio de transactivación, que a diferencia del primero, es dependiente de la unión del ligando, denominado AF-2 ¹⁹.

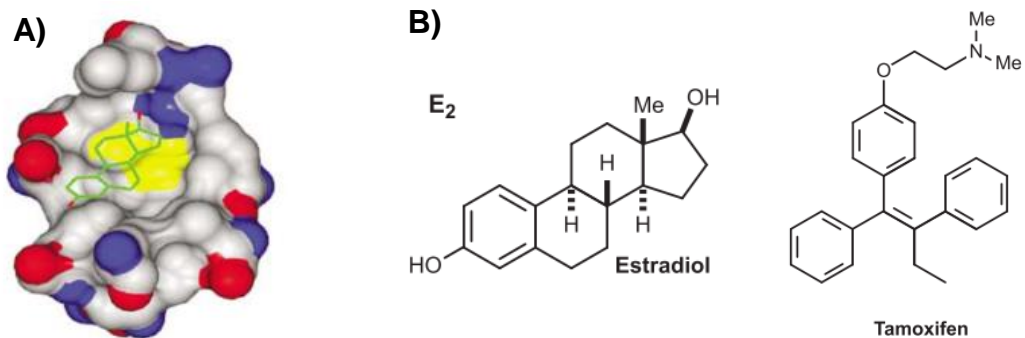


Figura 2. Dominio de unión al ligando y estructura química del E2 y el Tamoxifeno.

A) Vista tridimensional parcial del bolsillo hidrofóbico donde se acomoda una molécula de E2 en el dominio de unión al ligando. Modificado de *Nettles et al., 2007 (18)*. **B)** Estructura química del ligando natural del receptor, el 17- β -estradiol o E2 y la estructura del Tamoxifeno, uno de los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs) más conocidos. Modificado de *Arnal et al., 2017 (1)*

b) Mecanismos de regulación

La regulación mediada por el ER α se establece a través de dos mecanismos principales (genómico y no genómico), bajo los que a su vez se engloban distintas vías (figura 3). La regulación “genómica” por su parte, ha sido la más estudiada y la que se le concedió mayor relevancia, en la cual, el ER α actúa como factor de transcripción activando o reprimiendo la expresión de los genes diana ^{1,20}. Existe una extensa bibliografía acerca de las distintas vías reguladas por el ER α a través de este mecanismo, algunas

de las cuales mencionaremos más adelante. Por otro lado, más recientemente, han adquirido una mayor relevancia los mecanismos de “no genómicos” mediados por el ER α asociado a la membrana plasmática. De esta forma el ER α modula la actividad de ciertas quinasas, desencadenando así varias vías de señalización en respuesta al E2. Las vías que se engloban bajo esta forma de acción del ER α presentan las características de las vías de señalización denominadas como MISS (“membrane initiated steroid signaling”) o “señales de respuesta a esteroides iniciadas en la membrana”^{1,21}.

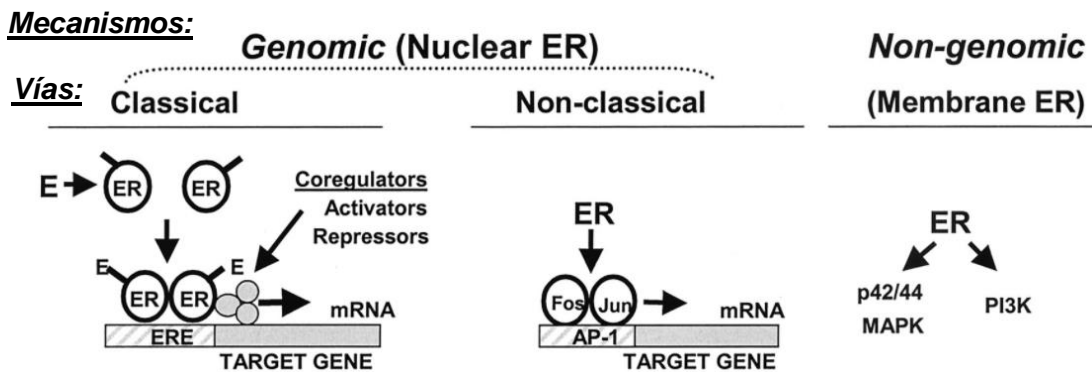


Figura 3. Mecanismos de acción del ER α .

Se esquematizan los distintos mecanismos de acción del ER α . Por un lado los mecanismos a nivel genómico, a través de la vía clásica (izquierda) o a través de la vía no clásica (centro). Por otro lado los mecanismos no genómicos desencadenando cascadas de quinasas (derecha). E: Estrógeno. Tomado de *Fisher et al. 1988 (8)*

Retomando los mecanismos de regulación a nivel genómico, se han descrito dos vías de acción del receptor como factor de transcripción, la vía clásica mediante la cual el receptor se une directamente al ADN en los EREs y la vía no clásica mediante la cual el receptor se une indirectamente al ADN a través de otros factores de transcripción de manera ERE independiente²¹. Hasta hace algunos años, el modelo de regulación de la transcripción mediado por el ER α era relativamente simple. La unión de un ligando agonista como el E2 lleva a que el ER α experimente cambios conformacionales que permiten su dimerización y unión al ADN en los ERE

de los genes diana, seguido del reclutamiento de la maquinaria de transcripción que conlleva a la expresión de estos genes. Los antagonistas, por otro lado, son ligandos que compiten con la unión de los agonistas, impidiendo la interacción del receptor con las secuencias diana. Sin embargo, recientemente se ha descubierto un número cada vez mayor de factores correguladores que se unen al ER α estimulando o inhibiendo la expresión de genes diana y como consecuencia, cada vez más se reconoce la importancia de estos correceptores en la actividad del receptor ⁶.

En ausencia del ligando, el ER α habitualmente se encuentra soluble en el citoplasma unida a la chaperona Hsp90 (también puede encontrarse en el núcleo o asociado a la membrana plasmática). La unión del ligando al ER α induce un cambio conformacional que lleva a la disociación de Hsp90, exponiendo los principales sitios de dimerización y transactivación presentes en el dominio E del ER α . Habitualmente es importante también la fosforilación del dominio D y/o E del receptor para la activación del mismo. A través de la vía clásica, como mencionamos, el ER α activado forma homo o heterodímeros (con el ER β) y regula la transcripción mediante su unión cooperativa a los elementos ERE en el ADN ¹ y el reclutamiento de otros factores de transcripción. Hasta hace no mucho tiempo se creía que estos elementos de respuesta a estrógenos se encontraban principalmente en los promotores proximales de los genes diana o en sus cercanías. Estudios recientes demostraron que la gran mayoría de los sitios de unión del ER α se encuentran en regiones distales de los genes regulados por éste ²². De esta forma el ER α regula la transcripción de sus genes diana a distancia mediante el reclutamiento de otros factores de transcripción a través de sus dominios de transactivación AF-1 y AF-2. Entre estos otros reguladores se encuentran coactivadores y correpresores, que generalmente presentan actividad enzimática intrínseca implicada en la remodelación de la cromatina, en las modificaciones

postraduccionales de otras proteínas, en la iniciación de la transcripción, en la elongación y splicing del ARNm o en la terminación de la transcripción (figura 4). Algunos de estos corre reguladores también actúan como sitios de unión que facilitan el reclutamiento de otros componentes de la maquinaria transcripcional ¹.

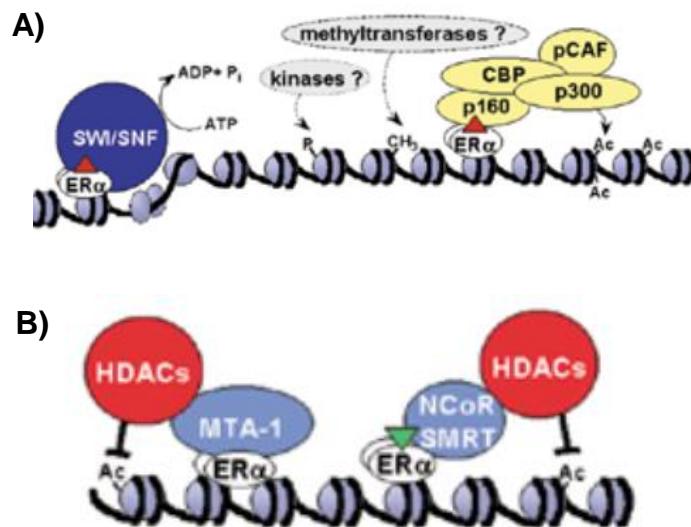


Figura 4. Proteínas modificadoras de la cromatina implicadas en la regulación de la transcripción mediada por ERα.

A) En presencia de un agonista (triángulo rojo), el ERα recluta un complejo de remodelación de cromatina dependiente de ATP (SWI / SNF) y enzimas modificadoras de histonas hacia los promotores de los genes de respuesta a estrógenos, por ejemplo las histonas acetil-transferasas (HAT) p160, CBP, p300 y pCAF. **B)** Varios cofactores reprimen la transcripción mediada por el ERα unido a un antagonista (triángulo verde), dirigiendo las desacetilasas de histonas (HDACs) a los promotores unidos a ERα. Modificado de *Moggs et al.* (21)

Como mencionamos anteriormente, entre los mecanismos regulatorios a nivel genómico se encuentra la vía “no clásica”, en la cual la unión del ligando al ERα promueve su interacción con otros factores de transcripción como AP-1, Sp1 o NF-κB ¹⁰. Los complejos formados por el receptor y estos factores se unen al ADN por medio de estos últimos, regulando la actividad

transcripcional de ciertos genes sin la necesidad de que los mismos presenten un ERE en sus secuencias reguladoras (figura 5)

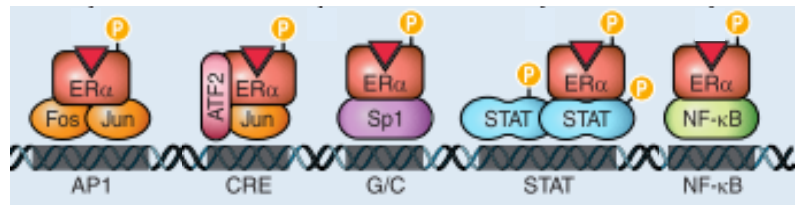


Figura 5. Factores de transcripción reclutados en la vía no clásica.

Se presentan algunos de los factores a los que se asocia el ER α para mediar su acción, uniéndose a regiones del ADN de forma independiente de los ERE. Modificado de Arnal et al., 2017 (1)

c) Bases moleculares de la respuesta tejido-específica de los ERs

El uso de agentes farmacéuticos dirigido contra el ER α ha revelado la naturaleza tejido-específica de las respuestas desencadenadas por el ER α . Originalmente, estas terapias hormonales contra los tumores mamarios, que tenían como blanco el ER α , desarrollaban un gran número de efectos secundarios en los pacientes tratados, ya que afectaban el funcionamiento del receptor en todos los tejidos. Por este motivo ha tomado gran relevancia en la medicina el desarrollo de los fármacos conocidos como Moduladores selectivos de los ER (SERMs). Los SERMs regulan las funciones del ER α de forma tejido-dependiente, actuando como agonistas en ciertos tejidos y como antagonistas en otros. Entre ellos se encuentra el tamoxifeno que actúa como antagonista en el tejido mamario y como agonista en el útero y tejido óseo. La respuesta específica de cada tejido a los distintos compuestos estrogénicos está determinada en parte por los patrones de expresión de los distintos subtipos de ERs y de sus correguladores, específicos de cada tipo celular. Los dos subtipos, ER α y ER β , pueden mediar funciones distintas dependiendo de la naturaleza de los ligandos unidos, las modificaciones postraduccionales que presenten y su

interacción con distintos cofactores y elementos de respuesta en los promotores ^{10,21}.

Desafortunadamente, algunos tumores mamarios se vuelven resistentes a la terapia hormonal. En la actualidad, un área importante de investigación se centra en dilucidar los procesos que provocan la resistencia a los fármacos antiestrogénicos, para lo que han planteado dos hipótesis principales. Una hipótesis plantea que la resistencia es debida a cambios en los niveles de expresión de cofactores en células resistentes en relación a células sensibles al tratamiento ²¹. La segunda hipótesis se basa en el hallazgo de que los tumores de mama con altos niveles de ER α responden mejor al tratamiento con tamoxifeno. Por lo tanto, la pérdida de la expresión o de funcionalidad del ER α podría ser una forma de adquirir resistencia al tamoxifeno ²¹.

Hoy en día sabemos que algunos tumores mamarios sensibles al tratamiento hormonal se vuelven resistentes al mismo cuando sufren un proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM), cambiando su fenotipo de uno epitelial diferenciado a uno mesenquimal (desdiferenciado). Las células que sufren dicho proceso presentan una reducción de la actividad y/o de expresión del ER α y un aumento en la actividad de receptores de factores de crecimiento ²³.

1.3. Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM)

Entre los pacientes con cáncer de mama, más del 90% de las muertes no son causadas por el tumor primario, sino por el producto de su metástasis en sitios distantes ²⁴. Por lo tanto, comprender el mecanismo que dirige el proceso de metástasis en el cáncer de mama es muy importante para su detección temprana y tratamiento eficaz. Los mecanismos precisos que

están involucrados en la transición de un conjunto de células tumorales no invasivas a células con potencial metastásico aún no son del todo conocidos. Sin embargo, la acumulación de evidencia sugiere que un proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) es uno de los principales mecanismos implicados en la metástasis de este tipo de cáncer ²⁵.

Este proceso consiste en un conjunto de eventos celulares y moleculares que lleva a la transformación de células epiteliales en células migratorias. Muy recientemente sin embargo, esta idea simplificada de la TEM como un “switch” entre estos dos estados alternativos ha comenzado a cambiar por una más amplia y compleja que contempla un gradiente de estados intermedios o parciales, apoyada por una serie de estudios que demuestran la complejidad y heterogeneidad intrínseca de los distintos tumores y de sus contextos (figura 6) ²⁶.

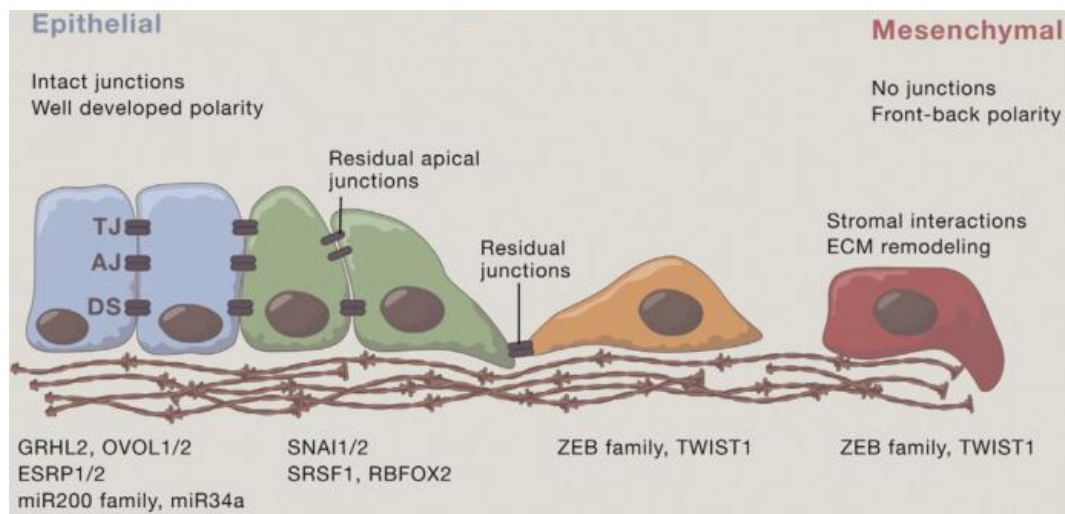


Figura 6. Gradiente de estados (fenotipos) durante el proceso de TEM

A medida que las células sufren la transición de izquierda (epitelial) a derecha (mesénquima), estas pierden secuencialmente la polaridad apico-basal, la adherencia célula-célula, y comienzan a ganar polaridad frontal y aumentan las interacciones con la matriz. En la parte inferior de la figura se describen los reguladores principales implicados en el mantenimiento de cada estado. TJ, unión estrecha; AJ, unión adherente; DS, desmosoma. Modificado de *Nieto et al. 2016 (26)*

La TEM fue observada hace algunos años en las etapas iniciales del desarrollo embrionario, en donde las células del epitelio embrionario temprano se internalizan para dar lugar al tejido mesodérmico. En esta etapa, las células deben desprenderse de las uniones que las mantienen adheridas con otras células, cambiar su forma y polaridad y migrar hacia otras regiones del embrión en desarrollo ^{26,27}. Por otro lado en organismos adultos la TEM se encuentra asociada a eventos de cicatrización de heridas o con diversas patologías, como la fibrosis y el cáncer ²⁸.

En medicina, un tumor es clasificado como maligno fundamentalmente por su capacidad de diseminación hacia otras regiones del organismo, siendo incapaz de hacerlo en sus etapas iniciales. En el curso de la enfermedad la masa del tumor se vuelve heterogénea, ya que las células tumorales primarias acumulan alteraciones genéticas de forma independientemente e interactúan de forma particular con su microambiente local ²⁹. Como resultado, en ciertas áreas del tumor, un pequeño número de células pueden escapar a las reglas del comportamiento celular normal, perdiendo su adhesión con las células vecinas, migrando e invadiendo localmente el tejido circundante. En un paso siguiente, el acceso a la circulación sanguínea o los vasos linfáticos conduce a su diseminación en el cuerpo y finalmente al restablecimiento en sitios distantes. El primer paso determinante de este proceso es la invasión a través de la membrana basal, requiriendo de una serie de cambios como las modificaciones en la polaridad de las células, en las interacciones célula-célula y célula-matriz, la remodelación de la matriz extracelular, las modificaciones en el citoesqueleto y el aumento en la capacidad migratoria ³⁰. Algunos de estos cambios se resumen en la figura 7.

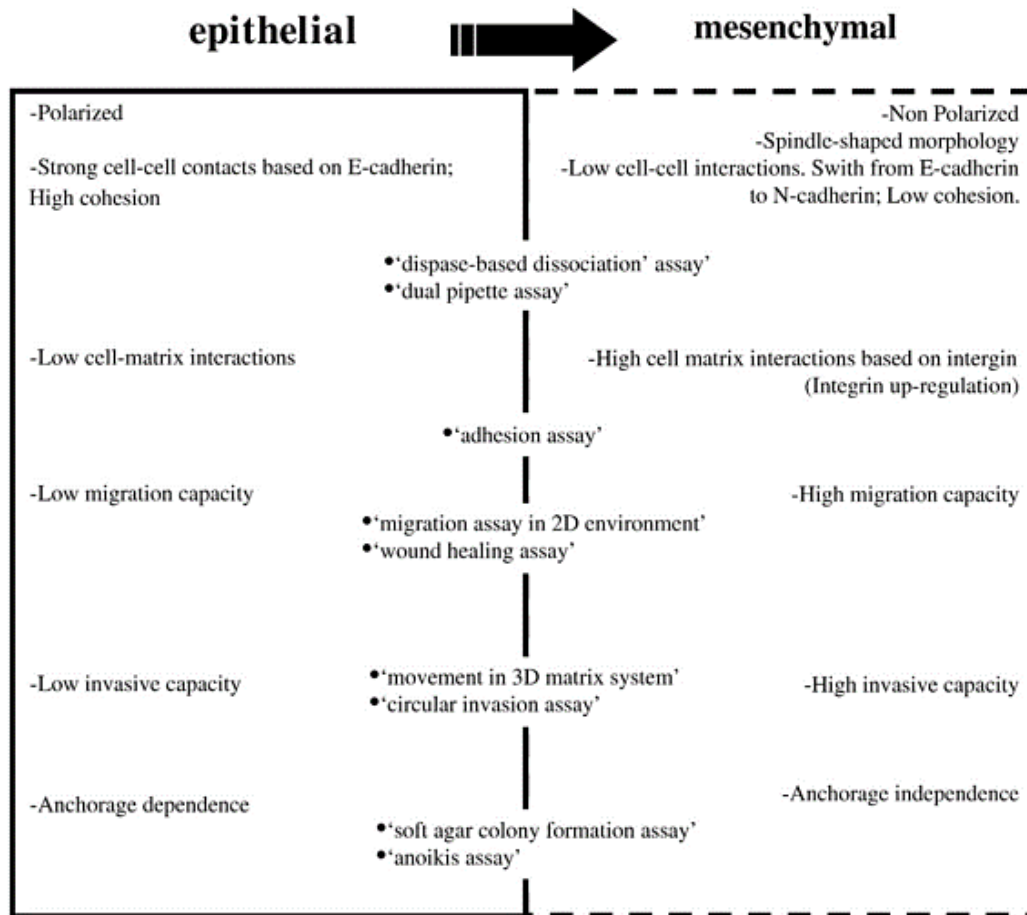


Figura 7. Características principales de los estados principales de la TEM.

Se resumen las principales características que son modificadas durante el proceso de TEM. En el centro de la tabla de presentan algunos métodos para estudiar cada característica in vitro. Modificado de *Voulgari et al. 2009 (27)*

Las células desdiferenciadas durante la TEM pueden revertir esta condición y reconvertirse nuevamente en un tipo epitelial a través de un proceso inverso conocido como transición mesenquimo-epitelial (TME), un proceso asociado a la instalación de metástasis en órganos lejanos (figura 8) ³¹.

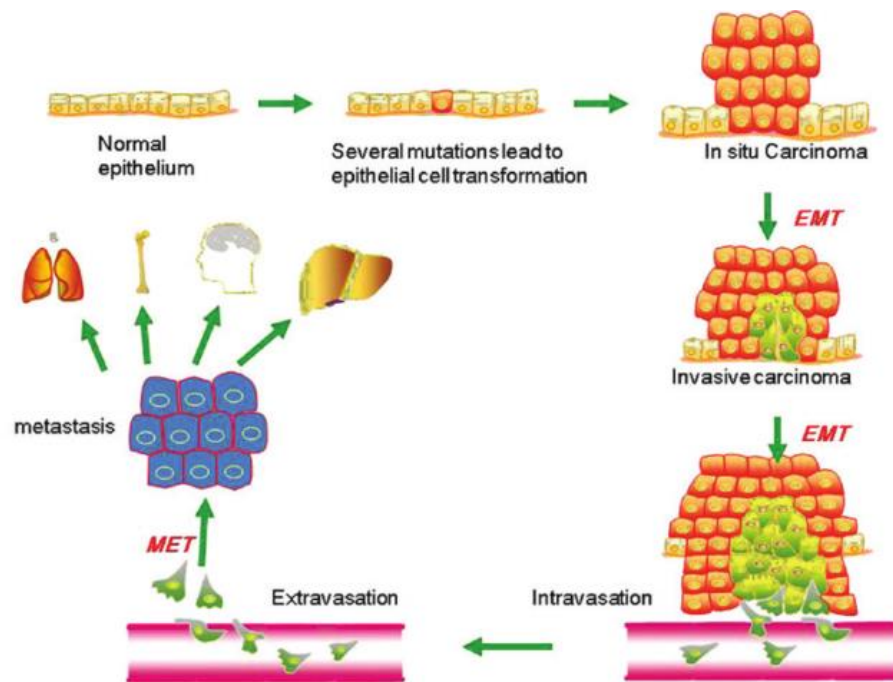


Figura 8. Secuencia de eventos en la progresión del cáncer de mama.

Principales eventos que ocurren en la progresión del cáncer de mama. EMT: transición epitelio-mesenquimal, MET: transición mesenquimo-epitelial Modificado de *Liu et al. 2016 (37)*

a) Marcadores característicos de la TEM en cáncer de mama

Se han descrito una serie de marcadores presentes en la mayoría de los tumores de mama que sufren una TEM. Entre los más conocidos encontramos en primer lugar, la E-cadherina, una proteína de superficie que permite la adhesión entre células epiteliales ³². La disminución en la expresión de E-cadherina es el marcador típico de células que se encuentran cursando un proceso de EMT. La supresión de la función o expresión de esta proteína conduce a las células hacia un fenotipo mesenquimal y produce una mayor migración e invasión celular. Por lo general tiene lugar un cambio en el tipo de cadherina expresado en la célula, pasando de E-cadherina a N-cadherina ³². En segundo lugar, la proteína CD44, presente en la superficie celular modulando la señalización celular al formar complejos con diversos receptores tirosín-quinasa,

también desempeña un papel importante en la metástasis del cáncer de mama. Algunos estudios han mostrado un cambio en la expresión de CD44 de la isoforma variante CD44v a la isoforma estándar CD44s durante la TEM ³³. En tercer lugar, la β -catenina es una proteína que se localiza en la membrana celular de células epiteliales normales y células tumorales no invasivas. En las células que sufren una TEM, la β -catenina se encuentra principalmente en el citoplasma o en el núcleo. La localización de β -catenina en el citoplasma es resultado de su disociación de la E-cadherina. Posteriormente, la β -catenina transloca al núcleo e induce la transcripción de genes que promueven la TEM ³⁴. Por último, otro marcador de la TEM es un aumento en la expresión de la vimentina, una proteína que forma parte de los filamentos intermedios. La vimentina se expresa en sitios de elongación celular y se asocia con un fenotipo migratorio ³⁵.

b) Regulación de la inducción / inhibición de la TEM

Numerosas investigaciones han mostrado la gran complejidad que presenta la regulación de la TEM, proponiendo una regulación a distintos niveles, que abarca mecanismos regulatorios mediados por modificaciones epigenéticas, control a nivel transcripcional mediado por una serie de factores, splicing alternativo y la regulación de la estabilidad y localización subcelular de ciertas proteínas (figura 9) ²⁶. A pesar de los esfuerzos para identificar redes reguladoras comunes a los procesos de TEM que ocurren en el desarrollo normal y a los que ocurren en procesos patológico, es claro que algunas vías pueden ser únicas para un evento de TEM dado, en un subconjunto particular de tejido o tumor. La regulación de la TEM clásica se centra en la supresión transcripcional de la molécula de adhesión e-cadherina ³⁶. Los factores de transcripción que modulan la TEM pueden ser clasificados en función de su capacidad para reprimir la expresión de e-cadherina de forma directa o indirecta ³⁷.

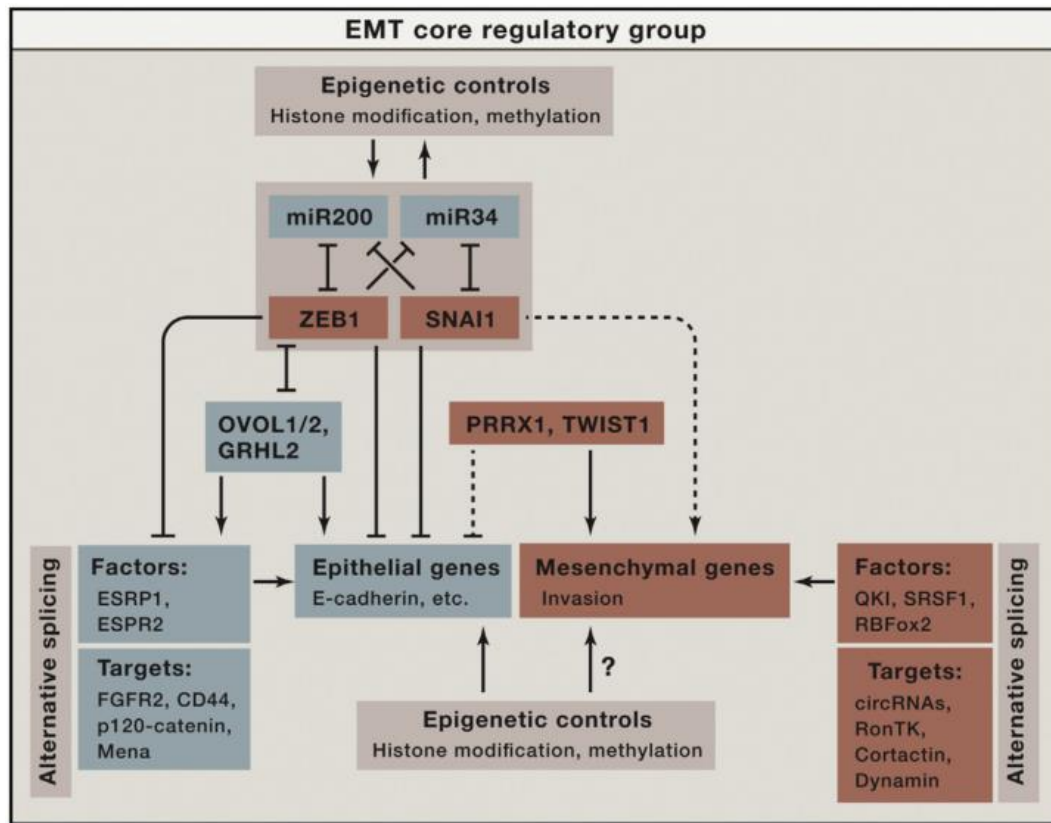


Figura 9. Maquinaria central de regulación de la TEM

La regulación de este proceso presenta una gran complejidad y abarca diversos mecanismos como modificaciones epigenéticas, controles a nivel transcripcional mediado por una serie de factores, splicing alternativo y regulación de la estabilidad y localización subcelular de ciertas proteínas. Extraído de *Nieto et al. 2016 (26)*

Algunos de estos factores de transcripción son específicos de la TEM como Snail1, Snail2 (o Slug), ZEB1 (o TCF8/ δ EF1), ZEB2 (o SIP1/Zfhx16) y Twist y otros participan de la regulación de vías más generales en procesos tumorales, como vías activadas por receptores de Her2/Neu en cáncer de mama. Algunos de ellos presentan funciones solapantes y pueden ser expresados en distintos estados de la TEM, mientras otros son esenciales en determinadas etapas. En cáncer mamario en particular, la participación de Snail1 parece necesaria en el inicio del proceso de TEM, mientras que Twist se vuelve esencial durante el establecimiento de este proceso ³⁷.

Otro conjunto importante de reguladores de la TEM lo conforman algunos microARNs. En cáncer de mama, varios microARNs fueron identificados como inductores o inhibidores de la TEM actuando a través de diferentes mecanismos ³⁸.

A su vez, como mencionamos anteriormente, otro importante regulador de la TEM es el ER α . En condiciones normales, la actividad del ER α promueve la diferenciación y el fenotipo epitelial. Esto se debe, en parte, a que inhibe la expresión de los factores de transcripción antes mencionados (como los Snail y los ZEB). Existen investigaciones que demuestran que el knock-down del ER α mediante siRNA en células de cáncer de mama ER α + conducen a una TEM y a un incremento de la migración celular ³⁰.

En último lugar, un mecanismo que ha sido muy estudiado en los últimos años en estrecha relación con el cáncer de mama, es el relacionado la activación de la vía de señalización MKL1/actina. Diversos estudios han mostrado que un aumento en la actividad de esta vía se asocia con una disminución en la expresión del ER α y un aumento en la expresión de factores de crecimiento, mostrando un fenotipo semejante al de células que atraviesa una TEM.

1.4. Vía de señalización MKL1/actina

Entre los mecanismos moleculares involucrados en la pérdida de la respuesta hormonal, estudios recientes sugieren que el factor de transcripción relacionado a la miocardina o MKL1 (“megakaryoblastic leukemia 1”, también denominado MRTF-A, MAL o BSAC) juega un rol importante en la progresión del cáncer actuando como promotor o supresor tumoral dependiendo del contexto celular ³⁹.

El factor MKL1 es un miembro de la familia de correguladores relacionados a la miocardina (MRTF, "myocardin-related transcription factor"), los cuales se caracterizan por regular la expresión génica sin unirse directamente al ADN ⁴⁰. Todos los factores de esta familia se unen como coactivadores al factor de respuesta al suero (SRF), el cual controla la expresión génica en diversos tejidos, regulando procesos esenciales relacionados a la supervivencia celular y la apoptosis ⁴¹. La unión del SRF al ADN se da en secuencias ricas en A/T conocidas como "CArG boxes", presentes en los promotores o en regiones intrónicas de los genes blanco ⁴².

A diferencia de la miocardina cuya expresión se encuentra confinada a los tejidos cardiovasculares y gastrointestinales, el gen de la MKL1 humana es expresado en un amplio rango de tejidos y codifica para una proteína de 931 aminoácidos que presenta una estructura modular conformada por varios dominios funcionales (figura 10) ⁴⁰. En su extremo N-terminal presenta varias repeticiones del motivo RPEL (llamado así por los aminoácidos que lo conforman), esenciales para la unión a la actina monomérica/globular (G-actina) y por tanto su retención en el citoplasma ⁴³. Adyacente a esta región se encuentra un dominio rico en glutamina (y por tanto rico en cargas positivas), necesario para su interacción con el SRF ⁴⁴. En la región central de la proteína se encuentra el dominio SAP implicado en algunos efectos relacionados al reordenamiento de la cromatina de forma independiente del SRF, aunque todavía se comprende parcialmente ⁴⁵. Por último en la región C-terminal, presenta un dominio de transactivación (TAD) importante para la regulación de la actividad del SRF ³⁹.

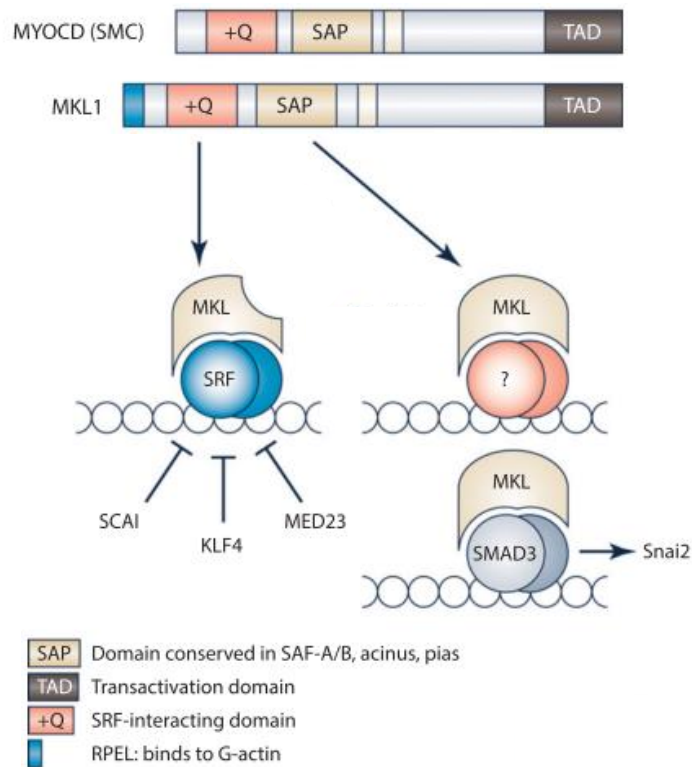


Figura 10. Dominios funcionales de los miembros de la familia de factores relacionados a la miocardina.

En la parte superior se esquematizan los dominios funcionales en la estructura de las proteínas. En la parte inferior se ejemplifican algunas de las vías de acción de estos factores, siendo principalmente asociado a SRF, o de forma independiente de SRF mediante el dominio SAP (todavía poco conocido). Modificado de *Swärd et al. 2016*.

La localización subcelular y la actividad transcripcional de MKL1 es regulada directamente a través de la interacción con la actina monomérica por medio de los motivos RPEL. Este mecanismo regulador involucra la señalización mediada por la GTPasa Rho A que regula la dinámica de la actina en la célula en respuestas a estímulos extracelulares ⁴⁶. En células no estimuladas, la MKL1 se localiza predominantemente en el citoplasma asociada G-actina. Tras la activación de RhoA, aumenta la formación de filamentos de actina (F-actina), consumiendo el pool G-actina presente en el citoplasma y en el núcleo. Esto genera la liberación de la MKL1 de la G-actina, lo que permite su importación al núcleo y permitiendo la interacción

con el SRF modulando su actividad (figura 11) ⁴⁶. Por otro lado, se ha demostrado que la G-actina nuclear facilita la exportación MKL1 fuera del núcleo y evita que MKL1 active los genes blanco de SRF. Por lo tanto, la G-actina celular regula MKL1 en tres niveles: importación nuclear, exportación nuclear y activación / inactivación nuclear de la transcripción dependiente de MKL1 ⁴⁶.

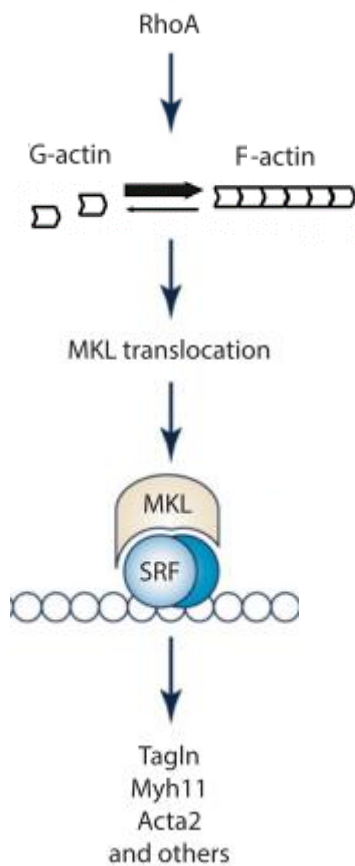


Figura 11. Esquema de la vía Rho/actina/MKL1.

Señales extracelulares que activan Rho A llevan a la formación de filamentos de actina, polimerizando los monómeros presentes en el citoplasma y núcleo. De esta forma, se produce la disociación entre la actina y MKL1, lo que permite su translocación al núcleo donde interacciona con SRF corregulando la transcripción de ciertos genes. Modificado de *Swärd et al. 2016*.

En relación con el cáncer de mama, se ha descrito que las células tumorales de epitelio mamario diferenciadas y sensibles al tratamiento hormonal, exhiben poca o nula actividad de MKL1 ³⁹. Por otra parte, el proceso de TEM en estas células produce la pérdida de la adhesión entre células, llevando un aumento en la relación F-actina/G-actina y en consecuencia, la activación de MKL1 ⁵. Estudios recientes demuestran la

existencia de una estrecha relación entre la actividad de MKL1 y el ER α ⁴⁷. Por un lado, la inhibición de la actividad de MKL1 favorece la transactivación del ER α a través de su dominio AF-1 mientras que la activación de MKL1 inhibe la actividad del ER α a través de su dominio AF-1, pasando a depender exclusivamente de su dominio AF-2, lo que reduce drásticamente su eficiencia de transactivación. Esta reducción de la actividad del ER α mediada por MKL1 conduce al escape hormonal (pérdida de respuesta al E2) y al aumento de la actividad de varios factores de crecimiento, apoyando el rol de MKL1 como un factor tumorigénico ^{5,48}.

Esto fue demostrado en gran parte por el Profesor Gilles Flouriot y su equipo, quienes desarrollaron un modelo basado en tres líneas celulares derivadas de una línea de cáncer mamario (MCF7) que fueron transfectadas de forma estable para expresar distintas variantes de MKL1 (figura 12) por medio de un promotor inducible por tetraciclina ^{5,47}. Una de las variantes transfectada presenta una delección de los primeros 200 aminoácidos del dominio N-terminal (MKL1- Δ N200) donde se encuentran los motivos RPEL involucrados en la interacción con la actina monomérica. De esta forma, al ser incapaz de unirse a la actina, ésta variante de MKL1 se encuentra constitutivamente activa en el núcleo, de ahí la denominación a la línea celular que la presenta como dominante positiva (D+). Luego del tratamiento con tetraciclina, esta línea adquiere un fenotipo correspondiente a células luego de un proceso de TEM. Por otro lado, la otra variante transfectada presenta deletados los primeros 301 aminoácidos del extremo C-terminal, donde se encuentra el dominio de transactivación (TAD). Esta variante se localiza principalmente en el citoplasma y se comporta como una variante con pérdida de función, por eso el nombre de la línea como dominante negativa (D-). Luego del tratamiento con tetraciclina, esta línea adquiere un fenotipo correspondiente a células luego de un proceso de TME. Para completar el

modelo, se utiliza como control una línea que fue transfectada con un plásmido vacío (sin ninguna variante de MKL1) que le confiere la resistencia a los antibióticos utilizados para la selección de estas líneas, Zeocina y Blasticidina, de ahí su nombre ZB. Esta línea sólo expresa la MKL1 endógena.

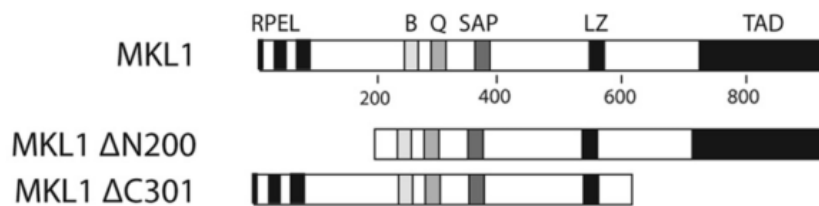


Figura 12. Representación esquemática de las variantes de MKL1.

La región N-terminal de MKL1 contiene motivos RPEL que median la unión a actina. La variante $\Delta N200$ carece de estos motivos por lo que no puede unirse a actina, encontrándose constitutivamente activa en el núcleo, originando el nombre de dominante positiva (D+) a la línea portadora. Por otro lado, la variante $\Delta C301$ carece del dominio de transactivación por lo que presenta una pérdida de función, de ahí la denominación de dominante negativa (D-) a la línea que la porta. Modificado de *Huet et al., 2009 (47)*.

En conjunto, estas tres líneas constituyen un modelo celular que está siendo caracterizado en profundidad para ser empleado como aproximación experimental de los procesos de TEM y TME; y de esta forma intentar comprender los cambios celulares y moleculares que ocurren durante la metástasis del cáncer mamario.

1.5. Objetivos

En el marco de la pasantía, este trabajo tiene como objetivo general, profundizar en la caracterización del modelo de transición epitelio-mesenquimal, MKL1-dependiente, conformado por las tres líneas celulares ZB, D+ y D-.

Objetivos específicos

- I.** Implementar un método de identificación/verificación de la identidad de las tres líneas celulares mediante detección de la expresión de las variantes de MKL1.
- II.** Estudiar el crecimiento de las tres líneas celulares que constituyen el modelo de TEM mediante curvas de crecimiento.
- III.** Analizar el consumo de glucosa y la producción de lactato, asociado al crecimiento de las tres líneas celulares, para profundizar en el conocimiento sobre su metabolismo energético.
- IV.** Estudiar la actividad del ER α y el efecto de la concentración de ligando en la eficiencia de transactivación del ER α endógeno en las tres líneas celulares.

2. MATERIALES

2.1. Líneas celulares

En esta investigación se trabaja con un modelo celular de transición epitelio-mesenquimal conformado por tres líneas celulares derivadas de la línea MCF-7 (generada a partir de un carcinoma mamario y que expresa un ER α funcional, N $^{\circ}$ de catálogo ATCC: HTB-22) que fueron transfectadas de forma estable para expresar distintas variantes de MKL1. Dos de estas tres líneas, además de expresar la MKL1 endógena, sobreexpresan distintas variantes de MKL1 por medio de un promotor inducible. La línea MCF7 ZB (notación originada por los antibióticos utilizados para la selección, Zeocina y Blastidina) fue transfectada con el vector vacío el cual les confiere la resistencia a los antibióticos pero no porta ninguna variante del gen de MKL1, por lo que esta línea sólo expresa la MKL1 endógena. Esta línea es la que se utiliza como control. La línea MCF7 D+ (notación que significa “dominante positiva”) fue transfectada de forma estable para sobreexpresar una forma de la proteína MKL1 en la cual fueron deletados los 200 primeros aminoácidos del dominio N-terminal ($\Delta N200$). La línea MCF7 D- (que significa “dominante negativa”) fue transfectada de forma estable para sobreexpresar una forma trunca de la proteína MKL1 en la cual fueron deletados los últimos 301 aminoácidos del dominio C-terminal ($\Delta C301$). Luego de inducida la expresión de las distintas formas de MKL1 con tetraciclina, las células adquieren diferentes fenotipos que corresponden a células antes de la transición epitelio-mesenquimal (control), luego de la transición y luego de una transición inversa o mesenquimo-epitelial, respectivamente ^{27,5,48}. Es importante mencionar que las distintas formas de MKL1 transfectadas en las células originando las líneas D+ y D- están fusionadas a un FLAG-tag. De esta forma, más adelante se describirá un método que permite diferenciar las tres líneas mediante western blot distinguiéndose las ZB por ausencia de la construcción MKL1-FLAG y las

D+ y D- por la diferencia de tamaño de las variantes MKL1-FLAG presentes en cada línea. Las líneas celulares recién descritas fueron proporcionadas por el Prof. Gilles Flouriot ⁴⁸. Se cuenta con un banco maestro y un banco de trabajo de dichas células, ambos realizados en el momento en que fueron recibidas las células, en la Unidad de Biología Celular (UBC) del Instituto Pasteur de Montevideo.

2.2. Medios de cultivo para las líneas celulares

a) Medio de mantenimiento

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Gibco™ GlutaMAX™ con rojo fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino sin tetraciclina (SFB) y con los antibióticos de selección Zeocina, concentración final 100 µg/mL y Blastidina, concentración final 5 µg/mL.

b) Medio de inducción/transfección

DMEM sin rojo fenol, suplementado con 2,5% de SFB charcoal-stripped, 1% de piruvato y 1% L-glutamina. A este medio se le agrega tetraciclina en una concentración final de 1 µg/mL para inducir la diferenciación celular. El suero charcoal-stripped se encuentra depletado de componentes lipídicos incluyendo hormonas, retinoides y ácidos grasos ligandos de receptores nucleares. Es necesario utilizar este suero como medio de transfección para que estos compuestos no interfieran en las medidas de actividad del ERα ⁴⁹.

2.3. Vectores

El plásmido ERE-tk-luc utilizado en el ensayo de genes reporteros contiene el gen de luciferasa (luc) regulado por una copia del elemento de respuesta

a estrógeno (ERE) del gen de la vitelogenina de *Xenopus* y el promotor de la timidin-quinasa (tk) del virus del “herpes simple” en posición upstream (-150 a +50) ^{50,51}.

El plásmido pCMV SPORT-βgal que se usa para normalizar la expresión de luciferasa contiene el gen de la β-galactosidasa (β-gal) de *E. coli* clonado como un fragmento Not I en el plásmido pCMV SPORT1. El gen β-gal es controlado por un promotor de Citomegalovirus (CMV) en posición upstream, seguido por el t-intrón SV40 y la señal de poliadenilación. El plásmido también contiene el gen de la β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina para la selección de las bacterias transformadas ⁵² (el mapa del plásmido se muestra en el anexo).

2.4. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en los distintos ensayos con sus características y las diluciones respectivas se describen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en la investigación. Se detallan algunas características de los mismos.

	Anticuerpos	Fabricante	Origen	Características	Dilución
Primarios	Anti-ERα (F-10)	Lab. Sta Cruz	Ratón	Monoclonal	1:200
	Anti-FLAG (OctA-Probe (G-8))	Lab. Sta Cruz	Ratón	Monoclonal	1:800
	Anti-β-tubulina E7	University of Iowa	Ratón	Monoclonal	1:80
Secundarios	Anti-IgG de ratón	Promega	-	Conjugado a HRP	1:2000
	Anti-IgG de conejo	Promega	-	Conjugado a HRP	1:2000

3. MÉTODOS

3.1. Condiciones de cultivo de las líneas celulares para los distintos ensayos

A continuación se detallan las distintas condiciones de cultivo que fueron utilizadas para cada ensayo:

a) Condiciones de mantenimiento

Crecimiento en monocapa (adherentes) en botellas T25 o T75, conteniendo 5 y 13 mL de medio de mantenimiento (ver Materiales) respectivamente, en una estufa a 37°C con atmósfera controlada con 5% de dióxido de carbono.

b) Curva de crecimiento, consumo de glucosa / producción de lactato

El procedimiento que se describe a continuación se llevó a cabo dos veces de forma independiente, una vez para obtener los valores de la curva sin inducción y la otra para obtener los valores de la curva con inducción con tetraciclina. La única diferencia fue el agregado de tetraciclina al medio de inducción en el segundo caso.

Partiendo de una botella T75 de cada línea celular con un crecimiento no mayor al 80% de confluencia (necesario para que las células se encuentren en fase exponencial, porcentajes mayores de confluencia podrían generar una fase lag prolongada obteniendo curvas con crecimientos muy bajos) las células se tripsinizan con 1,5 mL de tripsina 1X y luego se neutraliza la tripsina con 1,5 mL de medio de mantenimiento. Se hace un recuento por triplicado en cámara de Neubauer y se transfiere a un tubo Falcon de 50 mL el volumen de células necesario para sembrar 2×10^5 células en 21 pozos ($4,2 \times 10^6$ células) en placas de 12 (en la

práctica se siembran 18 pozos y el volumen restante correspondiente a 3 pozos se utiliza para hacer el recuento a tiempo 0 y para tomar el sobrenadante para el análisis de glucosa y lactato, pero para los cálculos lo consideramos de ese modo). Luego se centrifuga a 1000 g por cinco minutos para eliminar todo el medio y se resuspenden en 21 mL de medio de mantenimiento fresco para tener una concentración final de 2×10^5 células/mL. Se siembran 18 pozos de placas de 12 con 1 mL de la suspensión. De los 3 mL restantes se toman muestras para realizar un recuento por triplicado considerando dichos valores como el número de células para el día 0 (d_0) y luego se reparten en tres tubos Eppendorf. Se centrifugan a 2000 rpm por cuatro minutos para precipitar las células y los sobrenadantes se transfieren a tres tubos Eppendorf nuevos, que se conservan a -20°C hasta que se realizan las mediciones de glucosa y lactato. Las placas se guardan en la estufa.

Al día siguiente se transfiere el medio de los tres primeros pozos de la placa a tres tubos Eppendorf, se centrifugan a 2000 rpm por cuatro minutos y el sobrenadante se transfiere a tres tubos Eppendorf nuevos que se conservan a -20°C hasta que se realizan las mediciones de glucosa y lactato. En los tres pozos donde se retiró el medio se agregan 0,5 mL de PBS 1X por las paredes del pozo, se agita la placa muy suavemente, se retira el PBS y se agregan 400 μL de tripsina 1X. Se lleva la placa a la estufa por seis minutos y a continuación se agrega 400 μL de medio de mantenimiento para neutralizar la tripsina. Se homogeneiza cada pozo por unos segundos con la pipeta y se transfieren las células de los pozos tripsinizados a tres tubos Eppendorf para hacer el recuento del día 1. A continuación se realiza el cambio de medio de mantenimiento a medio de inducción, con o sin el agregado de tetraciclina, para los ensayos con o sin inducción respectivamente. Se retira el medio de todos los demás pozos que no fueron tripsinizados, se lavan con 0,5 mL de PBS 1X, se retira el

PBS, se agrega 1 mL de medio de inducción sin tetraciclina, en el caso de la curva de crecimiento sin inducción, o con una concentración final de $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina para el caso de la curva de crecimiento con inducción y se vuelve a guardar la placa en la estufa.

Al otro día y para los días siguientes hasta completar toda la curva, el procedimiento a seguir es el que se describe a continuación. Se transfiere el medio de tres pozos a tres tubos Eppendorf y se centrifugan a 2000 rpm por cuatro minutos. El sobrenadante se transfiere a tres tubos nuevos que se conservan a -20°C hasta que se realizan las mediciones de glucosa y lactato y los tubos Eppendorf con las células que sedimentaron se conservan para juntarlas con las células que son tripsinizadas a continuación. En los tres pozos donde se retiró el medio se agregan 0,5 mL de PBS 1X por las paredes del pozo, se agita la placa muy suavemente, se retira el PBS y se agregan $400 \mu\text{L}$ de tripsina. Se lleva la placa a la estufa por seis minutos y a continuación se agrega $400 \mu\text{L}$ de medio de mantenimiento para neutralizar la tripsina. Se homogeniza cada pozo por unos segundos y se transfieren las células de los pozos tripsinizados a los tres tubos Eppendorf que se conservaron anteriormente con las células precipitadas para hacer el recuento del día correspondiente (día 2 y los siguientes días). Por último, las placas se vuelven a guardar en la estufa para continuar con la curva los días siguientes.

c) Determinación de la actividad transcripcional del ER α endógeno

La actividad del ER se estudia empleando genes reporteros. Para determinar la actividad de transactivación directa del ER α (vía clásica), se transfectaron las células con un vector conteniendo una construcción del gen de la luciferasa controlado por el promotor de la timidina-quinasa (tk) y un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (se describe en Materiales, notación del vector "ERE-tk-luc"). Para normalizar los niveles de actividad

luciferasa, además de agregar el plásmido conteniendo las distintas construcciones se cotransfecta, en todos los casos, con el plásmido pCMV SPORT- β gal que contiene el gen de la enzima β -Galactosidasa bajo el control de un promotor de Citomegalovirus (CMV) (se describe en Materiales).

Para la determinación del efecto de la concentración de ligando en la actividad de transactivación directa del ER se realiza una curva de estimulación con seis diluciones seriadas de 17β -estradiol (E2) y un control con etanol, para cada una de las tres líneas. Para ello se siembra una placa estéril de 24 pocillos con 1×10^5 células/pozo de cada línea y se completa hasta un volumen final por pozo de 0,5 mL con medio de mantenimiento (sin antibióticos). Luego de transcurridas 24 horas de incubación se retira el medio de todos los pocillos, se hace un lavado con 0,5 mL de PBS 1X y se adiciona 0,5 mL por pocillo de medio de inducción con 1 μ g/mL de tetraciclina. A continuación se realiza la cotransfección de las células con 300 *ng* del plásmido ERE-tk-luc y 200 *ng* del plásmido pCMV SPORT- β gal utilizando el reactivo jetPEI (Polyplus transfection) de acuerdo a lo indicado en las instrucciones del fabricante. Transcurridas 48 horas de la inducción con tetraciclina, se retira el medio de todos los pocillos y se agrega 0,5 mL de medio de inducción conteniendo distintas concentraciones de E2 o una dilución $10^{-8}M$ de etanol (como control). Para preparar la curva de E2, se parte de una solución stock de E2 $10^{-4} M$ y se realizan seis diluciones seriadas en el medio de inducción: $10^{-8}M$, $10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$, $10^{-12}M$, $10^{-13}M$, las cuales se aplican a tres pocillos diferentes (triplicados). Al día siguiente se extrae el medio, se lava con 0,5 mL de PBS 1X, se agrega 100 μ L del Reporter Lysis Buffer 1X (Promega) y se llevan las placas a $-80^{\circ}C$ por al menos 1 hora (para favorecer la lisis).

3.2. Verificación de la identidad de las tres líneas celulares

Para llevar a cabo la verificación de la identidad de las líneas celulares se siembran dos botellas T25 con 1×10^6 células de cada línea y se agrega un volumen de medio de mantenimiento hasta un volumen final de 5 mL (sin los antibióticos de selección). Al día siguiente, se retira el medio de mantenimiento de todas las botellas y se agregan 2 mL de PBS 1X y se agita suavemente para lavar las células y a continuación se agregan 5 mL de medio de inducción en cada botella. A su vez, en una de las dos botellas de cada línea se le agrega tetraciclina para una concentración final de $1 \mu\text{g/mL}$ y se llevan las botellas a la estufa. Luego de 48 horas de incubación (con o sin tetraciclina), se procede a preparar los lisados celulares. Se retira el medio de todas las botellas, se hace un lavado rápido con 2 mL de PBS 1X y se agregan $300 \mu\text{L}$ del Reporter Lysis Buffer (Promega) por botella; posteriormente se guardan las botellas a -80°C por 24 horas. Al día siguiente se descongelan las botellas y con la ayuda de un rastrillo estéril se homogenizan los lisados celulares para luego transferirlos a tubos Eppendorfs para realizar una centrifugación corta y así eliminar los restos celulares. Al mismo tiempo se prepara un SDS-PAGE 8% (se utiliza este porcentaje de poliacrilamida para poder resolver bien las distintas formas de MKL1-FLAG ya que poseen altos pesos moleculares) que luego se carga con $30 \mu\text{L}$ de los extractos proteicos en cada pocillo, previamente diluidos en buffer de carga 6X y calentados a 90°C por 2 minutos. Posteriormente, se realiza la transferencia a una membrana de nitrocelulosa para llevar a cabo un western blot siguiendo el procedimiento que se describe más adelante en el punto 7 de este mismo apartado. Para detectar las proteínas en la membrana se utiliza una dilución 1:800 en solución de bloqueo del anticuerpo anti-FLAG "OctA-Probe (G-8)" (Laboratorio Santa Cruz, monoclonal de ratón, ver Materiales).

3.3. Medidas de glucosa y lactato en los sobrenadantes del cultivo y curva de crecimiento

Las medidas de glucosa y lactato se realizan a partir de los sobrenadantes que se extrajeron por triplicado de los pozos de la curva de crecimiento de las tres líneas celulares de los distintos días y que fueron conservados a -20°C. Para dichas medidas se utiliza el Bioanalyzer 4 (Nova Biomedical) un equipo que presenta dos electrodos, uno con una membrana que contiene la enzima glucosa oxidasa para medir la glucosa presente en la muestra y el otro con una membrana que contiene la enzima lactato oxidasa para medir el lactato. El equipo determina el valor de glucosa y lactato, y los expresa en g/L. Para poder comparar en términos cantidades consumidas y producidas en cada caso, se convierten los valores de g/L a mM.

A su vez, para comparar el consumo de glucosa o la producción de lactato entre las tres líneas en las distintas condiciones es necesario contemplar el número de células viables que consumen glucosa o producen lactato durante un determinado período de tiempo. Para ello se utiliza el concepto de velocidades específicas de consumo de glucosa y producción de lactato. De esta forma, se calcula el consumo o la producción acumulada de glucosa y lactato respectivamente y se grafican respecto a la “Integral de Células Viables o ICV”, de cuya gráfica se extrae la pendiente que se corresponde con la velocidad específica de consumo de glucosa o producción de lactato en cada caso. El consumo o la producción acumulada de glucosa o lactato se calcula como

$$[Glucosa \ o \ Lactato]_{t_o} - [Glucosa \ o \ Lactato]_{t_n}$$

donde t_o significa el primer tiempo en que se midió el lactato y t_n significa cualquier tiempo mayor al tiempo inicial. Por otra parte, recurrimos al concepto de ICV o “Integral de Células Viables” para contemplar el número de células que consumieron o produjeron glucosa o lactato

respectivamente en determinado período de tiempo. Este concepto se describe con mayor detalle en *Zhang, Wen, & Yang, 2011*⁵³ en donde se plantean calcular la productividad específica de cada célula. Poniéndolo en términos más sencillos, los autores de este capítulo presentan el concepto de ICV como: “*la capacidad de producción de la fábrica de células*” es decir “*¿Cuántos trabajadores hay? ¿Cuánto tiempo trabajan? El producto sumado de estos dos factores indica la capacidad de producción de un cultivo celular.*” La forma matemática de expresar el ICV,

$$ICV = \int_0^t X dt$$

donde X es el número de células viables y t el tiempo de cultivo.

3.4. Cultivo de bacterias, preparación de células competentes y transformación

Para la propagación de los vectores utilizados en el ensayo de genes reporteros, se utiliza la cepa de *Escherichia coli* DH5 α . Los cultivos se realizan en medio LB, a 37°C, con agitación a 200 rpm. Para la selección de las bacterias una vez transformadas se utiliza ampicilina en una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (los plásmidos utilizados presentan los genes de resistencia a ampicilina).

Preparación de células competentes y su transformación

Se utiliza el método de quimiocompetencia por tratamiento con cloruro de calcio (CaCl_2) siguiendo el protocolo que se describe brevemente a continuación. En condiciones de esterilidad, a partir de un stock de bacterias DH5 α se siembra una placa de LB-agar y se deja creciendo overnight en la estufa a 37°C. Al otro día se pica una colonia con un tip y se inocula un tubo que contiene 3 mL de LB estéril y se incuba overnight en un shaker a 37°C y 200 rpm. Al otro día se inocula un tubo que contiene

3 mL de LB estéril con 20 μL del cultivo de bacterias que se mantuvo incubando overnight. Se dejan crecer las células por 4 horas a 37°C con agitación, se transfiere 1 mL de este cultivo a un tubo Eppendorf estéril y se deja enfriar en hielo por 10 minutos. Se colectan las células centrifugando a 4000 rpm, a 4°C por 2 minutos. Se descarta el sobrenadante con cuidado de no distorsionar el precipitado. Se resuspenden las células en 1 mL de una solución de CaCl_2 100 mM enfriado previamente. Se vuelve a centrifugar las células a 4000 rpm, a 4°C por 5 minutos. Se descarta el sobrenadante con cuidado de no distorsionar el precipitado. Se resuspenden las células en 100 μL de una solución de CaCl_2 100 mM enfriado previamente. Por último, se incuban en hielo por 30 minutos previo a la transformación o se conservan a -20°C para utilizar al día siguiente (la competencia descende con el transcurso del tiempo, no se recomienda su uso posterior a las 48 horas de efectuada la quimiocompetencia).

Para la transformación de las bacterias, se incuban los 100 μL de células competentes (mencionados en el párrafo anterior) con 2 μL de ADN plasmídico (con una concentración entre 50 y 300 $\text{ng}/\mu\text{L}$) en hielo por 20 minutos. Se calienta la mezcla a 42°C por 90 segundos en el Accublock y se vuelve a poner en hielo por 2 minutos. Se agregan 200 μL de medio LB estéril sin ampicilina y se incuban a 37°C con agitación por 30 minutos. Se plaquean 100 μL de las bacterias transformadas con ayuda de un rastrillo estéril, en placas con medio selectivo LB-Agar con ampicilina y se dejan incubar toda la noche a 37°C. A partir de estos cultivos se generan stocks de las bacterias transformadas con los distintos plásmidos, que se guardan en DMSO 7%(v/v) a -80°C.

3.5. Purificación del ADN plasmídico, cuantificación y control de calidad

A partir de los cultivos de bacterias transformadas en medio LB, mencionados en el punto anterior, se realiza la extracción y purificación de los plásmidos utilizando el “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo). El protocolo de extracción se basa en el método de aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina. Se determina la concentración del ADN plasmídico obtenido de la purificación mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm por triplicado. Para verificar la calidad de la extracción y el estado de los plásmidos se realiza una electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, y se revela con el colorante “SYBR safe” con la ayuda de un transiluminador (UV).

3.6. Determinación de la actividad transcripcional del ER α mediante genes reporteros

Los ensayos de actividad se realizan de acuerdo a lo descrito en Fernández-Calero, Flouriot, & Marín, 2016 ⁵⁴.

En forma resumida, en primer lugar se transfectan las células con los distintos genes reporteros según se describe en el apartado “Cultivos celulares”. Las células se colectan en 100 μ L de Reporter Lysis Buffer 1X (Promega) por pozo. A continuación las células se almacenan a -80°C por lo menos durante 1 hora; el lisado celular se transfiere a un tubo Eppendorf y se centrifuga a 6000 g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y a partir de este se realizan los ensayos de actividad luciferasa y galactosidasa (ver figura 13).

La medida de actividad luciferasa se realiza por detección de luz emitida por la reacción enzimática utilizando el kit “Luciferase Assay System”

(Promega) y un luminómetro. Para ello se transfiere 20 μL de cada sobrenadante a un pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo opaco (importante ya que la señal de luminiscencia de los pocillos adyacentes podría interferir con la señal que está siendo medida). Luego se agrega 40 μL del reactivo de luciferasa por pocillo a toda una columna de la placa y se mide inmediatamente la intensidad de luz con el luminómetro (ya que esta decae rápidamente). Y de esta forma se prosigue de a una columna de la placa a la vez, hasta completar todas las medidas.

La medida de actividad beta galactosidasa se realiza por detección de color utilizando un sustrato que genera un producto coloreado y cuantificando la absorbancia a 405 nm con un lector de placas. Para ello se transfieren 60 μL de cada sobrenadante a un pocillo de una placa transparente de 96 pocillos. Luego se agregan 200 μL del mix previamente preparado para el ensayo de β -galactosidasa (ver anexo) a cada pocillo. También se agregan 200 μL a 3 pocillos vacíos para usar como blanco del experimento. Se incuba la placa a temperatura ambiente hasta que comienza a aparecer un leve color amarillo (generalmente alcanza con un par de minutos) y se mide la absorbancia a 405 nm en un lector de placas.

Para expresar los valores de actividad transcripcional directa del ER, primero se determina la actividad galactosidasa para cada condición (es decir para las distintas concentraciones de estradiol) restando la absorbancia promedio del blanco a cada una de las medidas. A continuación, se normalizan los valores de actividad luciferasa de cada condición respecto a los valores correspondientes de actividad galactosidasa obtenidos en el punto anterior. Se promedia el valor de actividad (normalizada) de los triplicados para la condición sin estradiol y se expresa la actividad luciferasa normalizada de cada réplica y para cada condición como "fold increase" respecto a este valor promedio de actividad

de la condición sin estradiol. Por último se promedian los valores de “fold increase” de los triplicados de los cuatro experimentos independientes (es decir un $n = 12$ para cada condición) y se grafica el “fold increase” promedio con su desviación estándar correspondiente para cada condición respecto a la concentración de ligando.

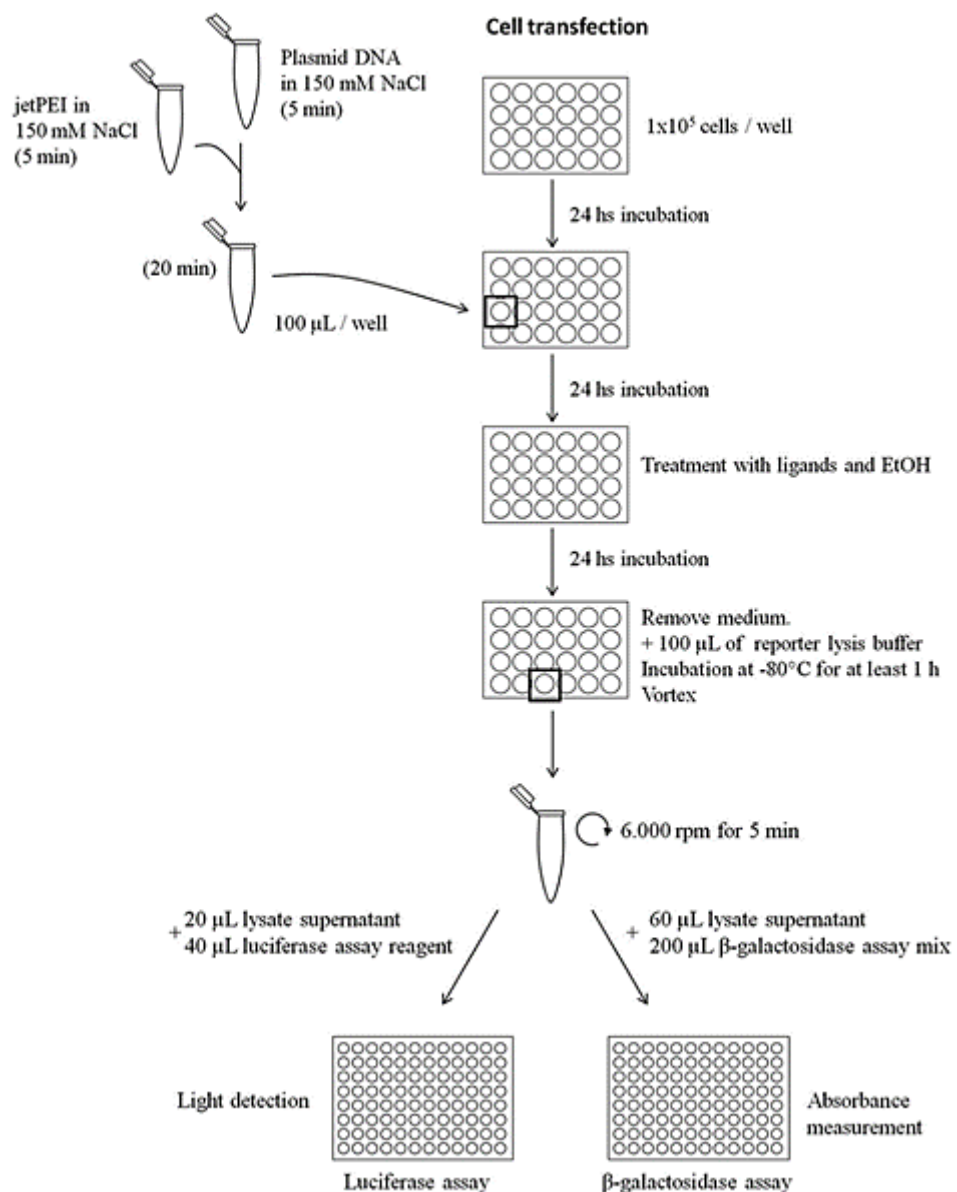


Figura 13. Esquema de los puntos más importantes del protocolo para la determinación de la actividad transcripcional del ER mediante genes reporteros.

Extraído de *Fernández-Calero et al. (2016) (54)*

3.7. Western Blot

Para realizar el western blot primero se agrega a cada muestra un volumen adecuado de buffer de muestra 6X (Sample Buffer, ver Anexo) y de PBS 1X de ser necesario y se calientan a 90°C entre 3 y 5 minutos. Se dejan enfriar por unos minutos y se siembran en un gel de SDS-PAGE 8% o 10% de poliacrilamida (se indica en cada caso), junto con un marcador de peso molecular pre-teñido (ver Anexo). Se completa la cuba con buffer de corrida (ver Anexo), se cierra el dispositivo para la electroforesis y se corre a 90 V hasta que el frente de corrida llega a la interfaz entre el gel concentrador y el gel separador, en este punto se aumenta el voltaje a 160 V y se deja migrar hasta ver el frente de corrida a medio centímetro de salir del gel. Se desarma el dispositivo de electroforesis y se monta el gel junto con una membrana de nitrocelulosa en el cassette que se utiliza para realizar la transferencia de las proteínas a la membrana, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (BioRad). La transferencia se realiza en el buffer de transferencia (ver Anexo) refrigerado (para evitar el calentamiento del buffer) a 400 mA por una hora. Se retira la membrana del dispositivo con la ayuda de unas pinzas y se la incuba en solución de bloqueo (ver Anexo) overnight a 4°C. Se retira la solución de bloqueo, se hace un lavado rápido con TBST (ver Anexo) y se incuba con el anticuerpo primario (las diluciones se hacen en solución de bloqueo) a temperatura ambiente, con agitación a 200 rpm por una hora. Se retira el anticuerpo primario (las diluciones óptimas se describen en la tabla de anticuerpos en el apartado de Materiales) y se realizan varios lavados con TBST (un total de 50 minutos de lavados). Luego, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario (anti-mouse o anti-rabbit dependiendo del anticuerpo primario que fue utilizado, ver Materiales) por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación a 200 rpm. Se retira el anticuerpo secundario y se realizan varios lavados con TBST (un total de 50 minutos de lavados). Finalmente se visualiza por

quimioluminiscencia incubando la membrana con el reactivo ECL (Thermo) durante un minuto, colocándola en el G-Box (Syngene) para su detección.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se menciona en los objetivos, este trabajo se centró en la caracterización del modelo de transición epitelio-mesenquimal (TEM) MKL1-dependiente, basado en tres líneas celulares derivadas de MCF7. Se presentarán en primer lugar los resultados de la puesta a punto de un método basado en el análisis por western blot para verificar la identidad de cada una de las tres líneas celulares. En segundo lugar, se presentará el estudio sobre el crecimiento de las tres líneas que comprenden el modelo, realizado mediante curvas de crecimiento, y en paralelo la determinación del consumo de glucosa y la producción de lactato asociado a dicho crecimiento. Por último, se mostrará el estudio de la actividad transcripcional del ER α endógeno llevado a cabo mediante medidas de actividad luciferasa en las tres líneas celulares.

4.1. Puesta a punto del cultivo de las tres líneas celulares

Las tres líneas celulares que constituyen el modelo expresan distintas formas de la proteína MKL1 cuando se inducen con tetraciclina por medio de un promotor inducible. Luego de ser inducidas, las células adoptan diferentes fenotipos correspondientes a células antes de la transición epitelio-mesenquimal (ZB, control), luego de la transición (D+) y luego de una transición inversa o mesenquimo-epitelial (D-).

Las condiciones de cultivo de estas líneas celulares, ya fueron descritas previamente ⁵. Las células crecen en monocapa, con relativa homogeneidad sobre toda la superficie del recipiente donde son mantenidas y con un ritmo moderado pero constante, semejante al de otras líneas celulares frecuentemente utilizadas. Cuando las células son mantenidas sin inducir, el crecimiento de las tres líneas es relativamente parejo, siendo la línea ZB la que presenta un crecimiento levemente más

acelerado que las otras dos (D+ y D-). De la misma forma, en ausencia de tetraciclina, la viabilidad celular determinada mediante exclusión del colorante azul tripán (por observación al microscopio), se mantuvo en valores entre el 90 y el 100% para las tres líneas. Por otro lado, cuando las células fueron tratadas con tetraciclina, observamos un mayor número de células muertas en la línea D+ en comparación con las otras dos líneas (figura 14).

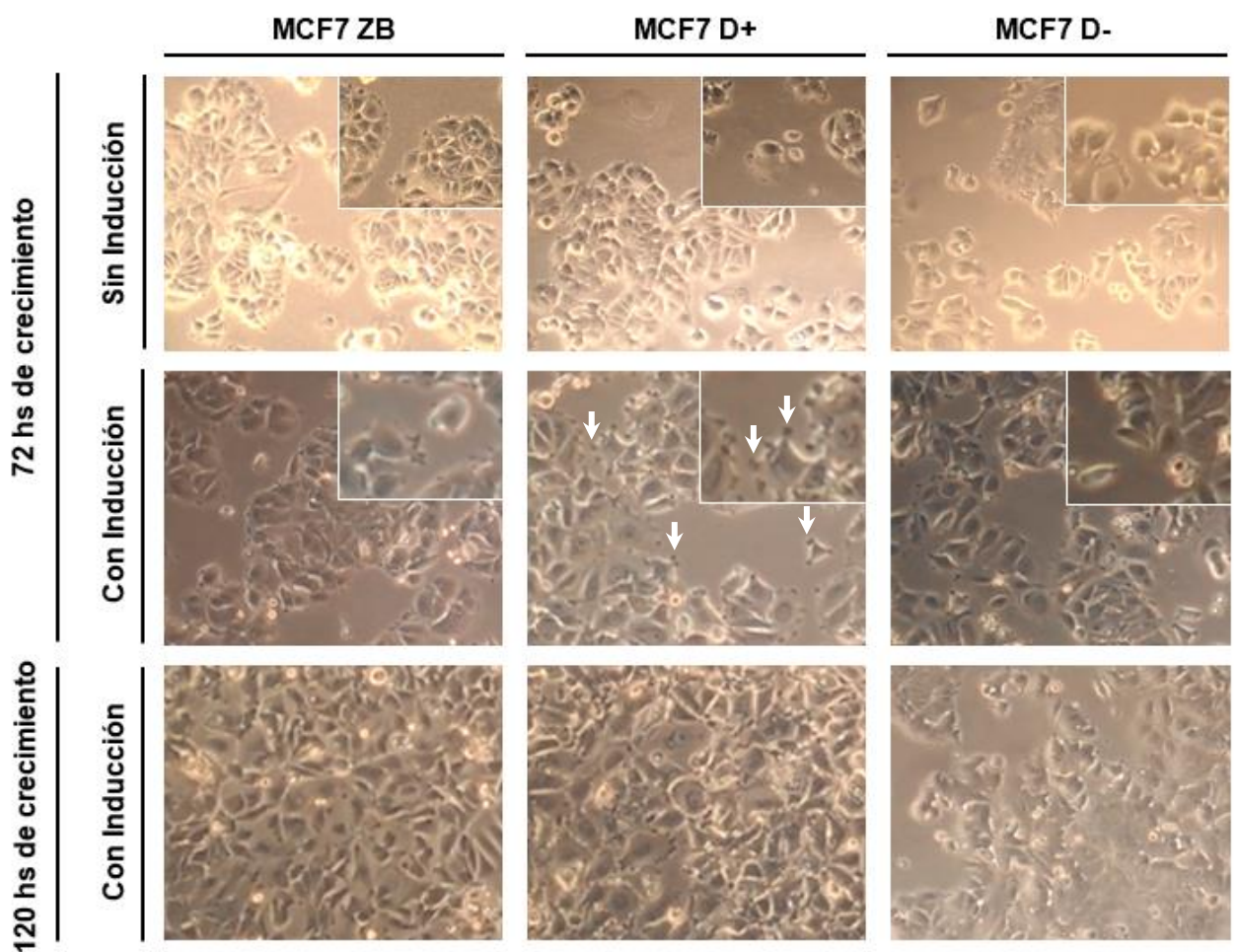


Figura 14. Líneas celulares MCF7 (ZB, D+ y D-)

Cultivos en monocapa de las tres líneas celulares que componen el modelo a las 72 horas de crecimiento en ausencia (fila superior) y presencia (fila central) de tetraciclina y a las 120 horas de crecimiento en presencia de tetraciclina (fila inferior). En el ángulo derecho de las figuras de los cultivos a las 72 horas con y sin inducción se muestran secciones de cultivo a mayor aumento. Las flechas blancas señalan las protuberancias que aparecen en mayor número en la línea D+.

En cuanto a la morfología, si bien no se realizaron estudios específicos con este propósito, cabe mencionar a modo de observación que, una vez inducidas, las células de la línea D+ presentan un mayor número de protuberancias de tamaño pequeño y forma irregular en la superficie celular (ver flechas blancas en la figura 14), además de presentar un mayor tamaño en comparación con las células de las líneas ZB y D- (observaciones realizadas al microscopio óptico).

4.2. Verificación de la identidad de las tres líneas celulares

Con el fin de corroborar la identidad de las tres líneas, se puso a punto un método relativamente rápido que permite distinguir las tres líneas celulares por medio de un western blot (ver el procedimiento completo en el apartado de Métodos).

Como se describió antes, las tres líneas celulares fueron transfectadas para expresar distintas variantes de la proteína MKL1 fusionada al FLAG-tag. La línea MCF7 ZB fue transfectada con un vector vacío, por lo que no sobreexpresa ninguna variante de MKL1. La línea MCF7 D+ fue transfectada de forma estable para sobreexpresar una variante de la proteína MKL1 en la cual fueron deletados los primeros 200 aminoácidos del dominio N-terminal ($\Delta N200$) y se encuentra fusionada al FLAG-tag. La línea MCF7 D- fue transfectada de forma estable para sobreexpresar una forma trunca de la proteína MKL1 en la cual fueron deletados los últimos 301 aminoácidos del dominio C-terminal ($\Delta C301$), también fusionada al FLAG-tag. Una vez inducida su expresión por tetraciclina, las distintas variantes de MKL1-FLAG pueden ser detectadas mediante western blot utilizando un anticuerpo específico anti-FLAG. De esta forma, es posible diferenciar las tres líneas, la ZB por ausencia de la construcción MKL1-FLAG y las D+ y D- por la diferencia de tamaño de las construcciones (la

D- presenta 101 aminoácidos menos que la D+). Este método fue descrito por primera vez en *Flouriot et al., 2014*⁴⁸.

En forma resumida, para verificar de la identidad de las líneas celulares se sembraron dos botellas T25 de cada línea. Al día siguiente, se retiró el medio de mantenimiento de todas las botellas y se agregó medio de inducción. A su vez, en una de las dos botellas de cada línea se agregó tetraciclina. Luego de 48 horas de incubación (con o sin tetraciclina), se procedió a preparar los lisados celulares. Se retiró el medio de todas las botellas, se hizo un lavado con PBS, se agregó el Reporter Lysis Buffer (Promega), y luego se guardaron las botellas a -80°C por 24 horas. Al día siguiente se descongelaron las botellas. Con la ayuda de un rastrillo estéril se homogeneizaron los lisados celulares y luego se transfirieron a tubos Eppendorfs para realizar una centrifugación corta y eliminar los restos celulares. Se realizó una electroforesis en SDS-PAGE 8% y se sembraron los extractos previamente diluidos en buffer de carga y calentados a 90°C. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa como se describe en los Métodos, y se reveló empleando un anticuerpo anti-FLAG. Se optimizaron las concentraciones del anticuerpo OctA-Probe (G-8) del Laboratorio Santa Cruz (monoclonal, obtenido de ratón, ver Materiales) así como los tiempos de incubación y de revelado.

De acuerdo a lo descrito, se esperaba obtener la ausencia de la banda de la construcción MKL1-FLAG para la línea ZB mientras que para las líneas D+ y D- se esperaba observar bandas de distintos pesos moleculares debido a las deleciones que presenta cada forma de MKL1-FLAG en estas dos líneas.

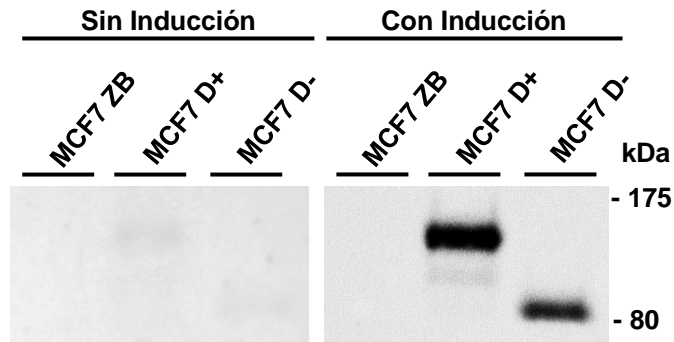


Figura 15. Identificación de las tres líneas celulares mediante western blot

Extractos proteicos de las líneas MCF7- ZB, D+, D-, sin inducir e inducidas con tetraciclina, son analizados mediante western blot, y revelados con anti-FLAG.

De acuerdo a lo observado en la figura 15 corroboramos la identidad de las tres líneas celulares. A su vez, los resultados muestran que la expresión de MKL1-FLAG en las líneas D+ y D- es mucho mayor en las células tratadas con tetraciclina respecto a las no inducidas, tal como se esperaba. De todas formas en el western blot se detecta una banda muy tenue que corresponde a una muy baja expresión de las variantes de MKL1-FLAG en ausencia de tetraciclina. Esto podría deberse a la presencia de trazas de tetraciclina en los sueros utilizados para el cultivo (aunque se utilizaron especialmente sueros comerciales sin tetraciclina) o a un “leaking” del sistema de expresión. Si bien esto no es relevante para nuestro objetivo, debemos tenerlo en cuenta. Por otro lado, en cuanto a la diferencia de tamaño observada entre las bandas obtenidas en D+ y en D- parecería que es mayor a 9.4 kDa que es lo esperado para la diferencia de aminoácidos entre las variantes de MKL1 presentes en D+ y D-. El Profesor Flouriot mencionó haber obtenido resultados similares ⁴⁸.

En suma, los resultados obtenidos del western blot fueron concluyentes, permitiendo diferenciar fácilmente las tres líneas celulares. Cabe destacar que se trata de un método sencillo y que resulta de gran utilidad en el laboratorio, ya que el manejo simultáneo de varias líneas celulares,

ensayos en diferentes condiciones y las réplicas, implican también un mayor riesgo de confusión, siendo fundamental poder verificar.

4.3. Curvas de crecimiento celular

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de este modelo celular estudiamos el crecimiento de las tres líneas celulares que componen el modelo, en presencia o ausencia de tetraciclina.

Para cumplir con este objetivo se realizaron dos curvas de crecimiento de 144 horas de duración (equivalente a 6 días de crecimiento), en una de las cuales las células fueron tratadas con tetraciclina. El procedimiento detallado se describe en el apartado de Métodos. Muy brevemente, se sembraron placas de 12 pocillos con células de cada una de las tres líneas. Al día siguiente se realizó el cambio de medio de mantenimiento por medio de inducción con tetraciclina (para la curva con inducción) y se mantuvieron en el mismo hasta el último día del experimento. Para hacer el recuento del número de células viables y células muertas por día, se tripsinizan las células de tres pozos de cada línea (triplicados), luego se tiñeron las células con azul tripán y se contaron en cámaras de Neubauer. De esta forma se obtuvo el número de células viables por día y se determinó el porcentaje de viabilidad (figura 16). Al mismo tiempo los sobrenadantes recuperados de cada pozo, se guardaron a -20°C para luego medir la concentración de glucosa y lactato.

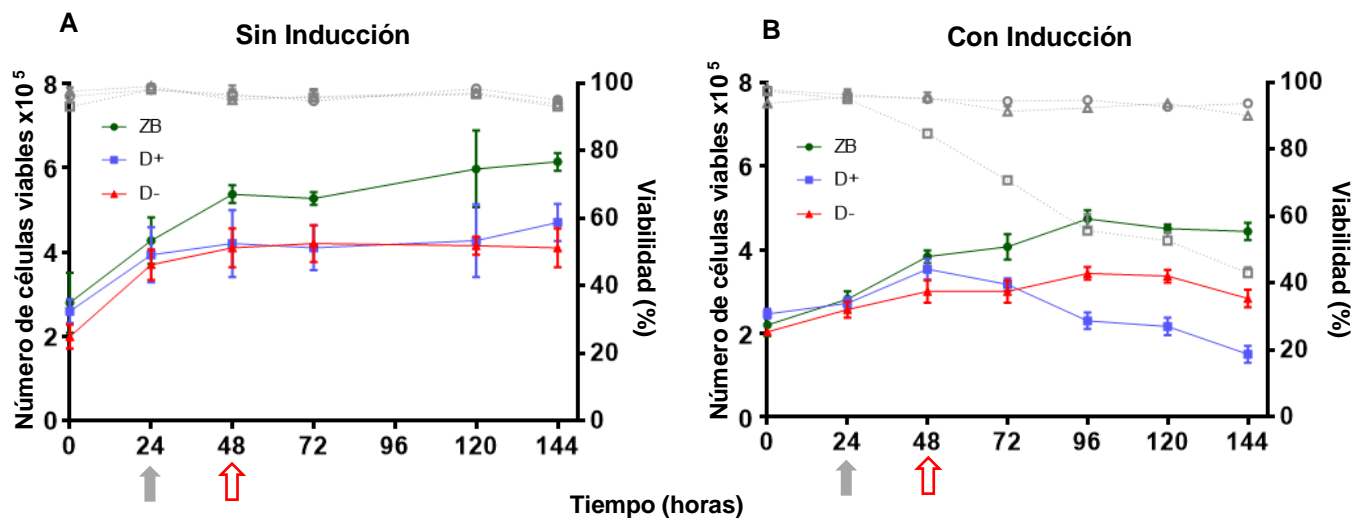


Figura 16. Curvas de crecimiento celular.

En el eje izquierdo se grafican los valores de células viables medidos hasta las 144 horas de crecimiento para **A)** células ZB, D+, D- sin inducir y **B)** células ZB, D+, D- inducidas con 1 µg/mL de tetraciclina (ZB círculo verde, D+ cuadrado azul y D- triángulo rojo). Los signos vacíos en gris corresponden a la viabilidad graficada en el eje de la derecha (ZB círculo, D+ cuadrado y D- triángulo). La flecha gris sólida indica el momento en el que se realizó el cambio de medio de mantenimiento al medio de inducción sin tetraciclina (A) o con tetraciclina (B). La flecha roja vacía indica el inicio de las medidas de concentración de glucosa y lactato (24 horas post-inducción). Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados experimentales.

Estos resultados muestran que el crecimiento de las células de la línea ZB se encuentra levemente aumentado respecto a las otras dos líneas. Por otro lado, se observa que la viabilidad de las D+ desciende cuando son tratadas con 1 µg/mL de tetraciclina, en comparación con la de las otras dos líneas que se mantiene cercano al 90%, lo que confirma las observaciones realizadas anteriormente. Este descenso en la viabilidad celular de la línea D+ resulta interesante ya que estas células, una vez inducidas con tetraciclina, son las que sufren el proceso de transición epitelio-mesenquimal tendiendo a adoptar un fenotipo con mayor capacidad para migrar. Sería importante determinar si este efecto es debido al propio proceso de transición por el cual las células sufrirían un proceso de muerte conocido como “anoikis” asociado al estrés que atraviesan al

desprenderse de la matriz extracelular, o si se relaciona con un efecto particular de la tetraciclina en estas células. En este mismo sentido, sería interesante estudiar el mecanismo involucrado en el proceso de muerte celular que está ocurriendo en dichas células. Estos aspectos exceden los objetivos planteados para este trabajo pero serán explorados en un futuro.

4.4. Determinación del consumo de glucosa y producción de lactato

Para profundizar en la comprensión del metabolismo energético de nuestro modelo celular, realizamos medidas de concentración de glucosa y lactato en los sobrenadantes del cultivo, que fuimos recuperando durante el estudio del crecimiento. Para ello utilizamos el Bioanalyzer 4 (Nova Biomedical), un equipo que cuenta con dos electrodos de membrana, uno específico para cada analito. De esta forma, se midió la concentración de glucosa y lactato de los sobrenadantes de los tres pozos (triplicados) que fueron extraídos cada día durante el crecimiento de cada una de las tres líneas (un total de 45 muestras). Esto fue realizado tanto para la curva sin inducción como para la curva con inducción. Se midió también la concentración de glucosa y lactato del medio que fue utilizado para la inducción (antes de dispensarlo en las placas), y se consideraron dichos valores como referencia.

En la figura 17 se muestran las curvas de consumo de glucosa para las tres líneas celulares en las dos condiciones (sin inducción y con inducción). De igual forma en la figura 18 se muestran las curvas de producción de lactato.

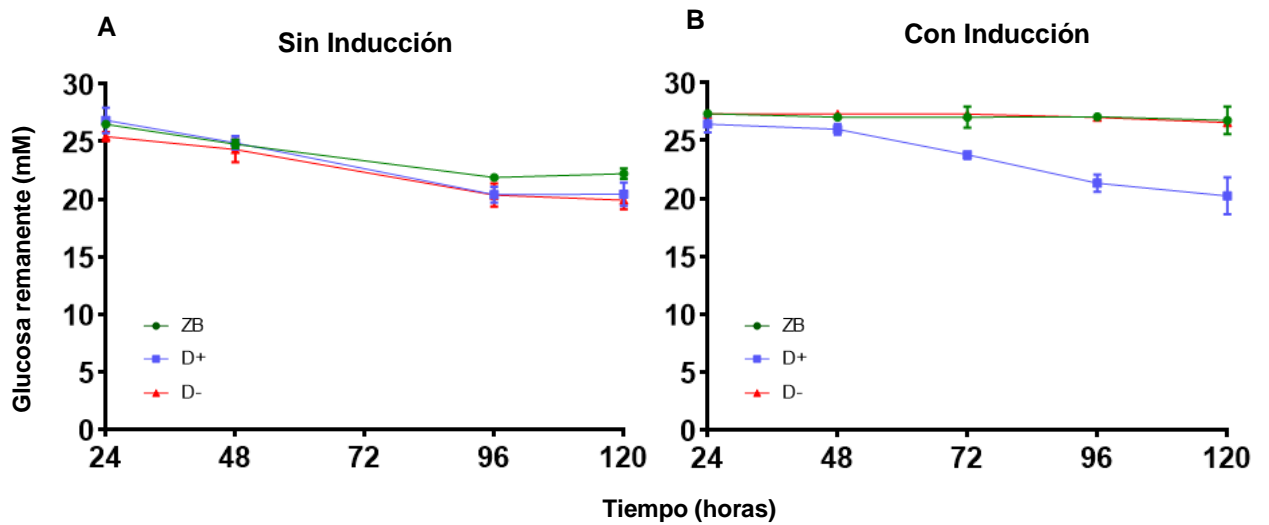


Figura 17. Curvas de consumo de glucosa.

Determinación de la concentración de glucosa en los sobrenadantes de: **A)** células ZB, D+, D- sin inducir y **B)** células ZB, D+, D- inducidas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina (ZB círculo verde, D+ cuadrado azul y D- triángulo rojo). El tiempo se expresa en horas de cultivo posteriores al inicio del tratamiento con tetraciclina (o medio control). Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados experimentales.

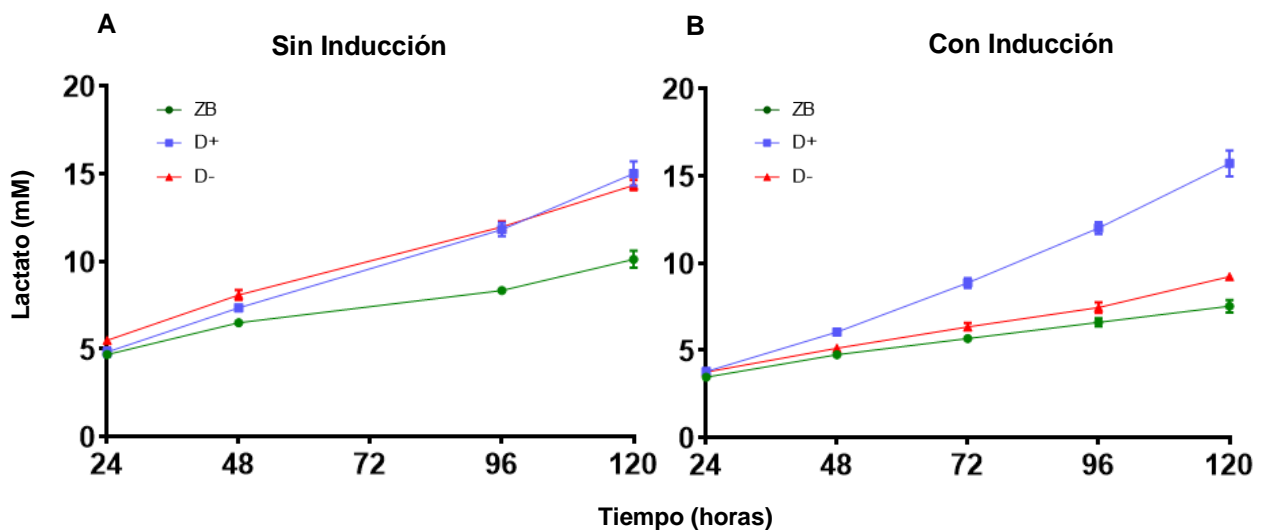


Figura 18. Curvas de producción de lactato.

Determinación de la concentración de lactato en los sobrenadantes de: **A)** células ZB, D+, D- sin inducir y **B)** células ZB, D+, D- inducidas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina (ZB círculo verde, D+ cuadrado azul y D- triángulo rojo). El tiempo se expresa en horas de cultivo posteriores al inicio del tratamiento con tetraciclina (o medio control). Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados experimentales.

Respecto al consumo de glucosa, se puede observar que, en ausencia de tetraciclina (figura 17A) el mismo se mantiene relativamente parejo entre las tres líneas celulares. En cambio, cuando las células son tratadas con tetraciclina (figura 17B), se evidencia un mayor consumo en los niveles de glucosa por parte de la línea D+ en relación a las otras dos líneas. Resulta llamativo el bajo consumo de glucosa que presentan las líneas ZB y D- cuando son tratadas con tetraciclina, tomando como referencia los valores obtenidos en ausencia de la misma. Esto podría deberse, en parte, a que el crecimiento de estas líneas es algo más lento en comparación a lo obtenido en ausencia de tetraciclina. De todas formas, estas observaciones serán confirmadas más adelante donde analizaremos los datos en forma de velocidades específicas de consumo de glucosa y producción de lactato, de tal forma de contemplar el número de células viables presentes en cada condición, ya que los efectos observados podrían estar asociados a la variabilidad en el número de células viables presente en cada línea y para cada condición.

Acompañando los resultados para el consumo de glucosa, se puede observar que la curva de producción de lactato presenta características semejantes. Por un lado vemos que en ausencia de tetraciclina (figura 18A) la producción de lactato se mantiene relativamente pareja entre las líneas D+ y D-, y permanece levemente por debajo para la línea ZB. En cambio, cuando las células son tratadas con tetraciclina (figura 18B), la producción de lactato aumenta en la línea D+, mientras que en las líneas ZB y D- se mantiene relativamente baja. Nuevamente, estas observaciones serán confirmadas a continuación.

Para comparar el consumo de glucosa o la producción de lactato entre las tres líneas en las distintas condiciones es necesario contemplar el número de células viables que consumen glucosa o producen lactato durante un

determinado período de tiempo y expresar los resultados en forma de velocidades específicas de consumo de glucosa y producción de lactato (la explicación detallada se expone en el apartado de Métodos). En la figura 19 se muestran las velocidades específicas de consumo de glucosa para las tres líneas celulares en ausencia y presencia de tetraciclina. De la misma manera en la figura 20 se muestran las velocidades específicas de producción de lactato.

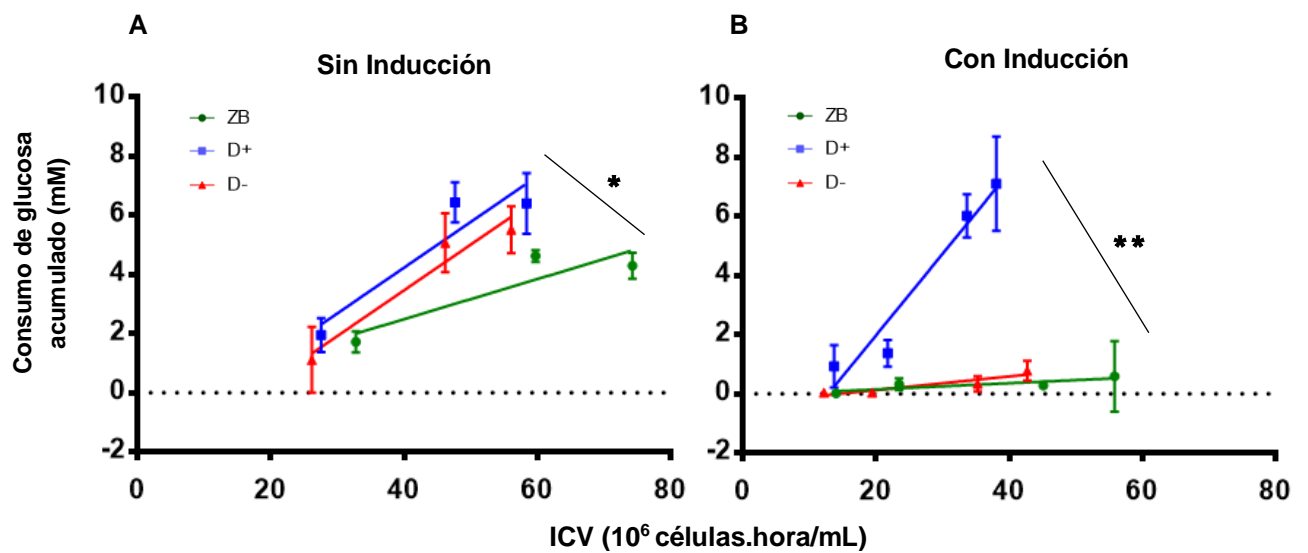


Figura 19. Velocidades específicas de consumo de glucosa.

Velocidad de consumo de glucosa para **A)** células ZB, D+, D- sin inducir y **B)** células ZB, D+, D- inducidas con 1 µg/mL de tetraciclina (ZB círculo verde, D+ cuadrado azul y D- triángulo rojo). Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados experimentales. * corresponde a un p-valor ≤ 0.05 y ** a un p-valor ≤ 0.01 .

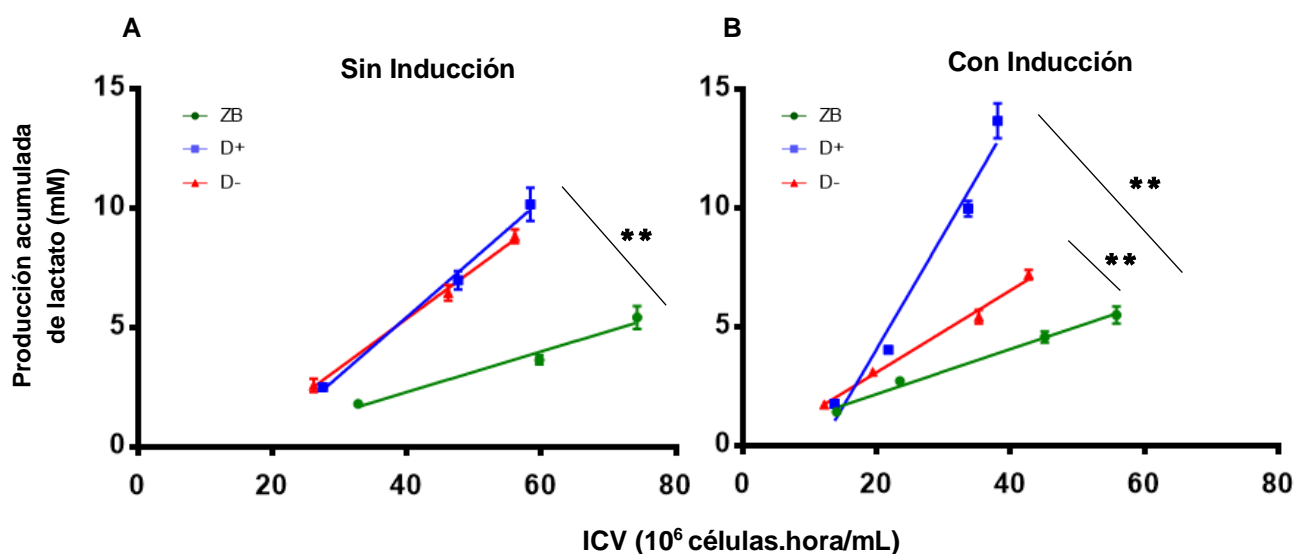


Figura 20. Velocidades específicas de producción de lactato.

Velocidad de producción de lactato para **A)** células ZB, D+, D- sin inducir y **B)** células ZB, D+, D- inducidas con 1 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina (ZB círculo verde, D+ cuadrado azul y D- triángulo rojo). Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados experimentales. * corresponde a un p-valor ≤ 0.05 y ** a un p-valor ≤ 0.01 .

Estos resultados confirman las observaciones que realizamos anteriormente a partir de las curvas de consumo de glucosa y producción de lactato. En primer lugar, para el consumo de glucosa, cuando las células son inducidas con tetraciclina, las células de la línea D+ presentan una velocidad de consumo de glucosa significativamente mayor ($27 \times 10^{-8} \text{ mM/cel. h}$) a la que presentan las células de las líneas ZB ($1.1 \times 10^{-8} \text{ mM/cel. h}$) y D- ($2.3 \times 10^{-8} \text{ mM/cel. h}$). Si bien vemos también que en ausencia de tetraciclina la velocidad de consumo de glucosa de la línea D+ es significativamente mayor que la de la línea ZB, la diferencia de velocidad obtenida entre las líneas D+ y D- no lo es. Por lo tanto, en ausencia de tetraciclina no apreciamos un consumo diferencial de glucosa por parte de la línea D+ respecto a las otras dos. En cuanto a los resultados obtenidos para las velocidades de producción de lactato podemos ver que acompañan lo observado para el consumo de glucosa. Cuando las células

se mantienen en ausencia de tetraciclina observamos que las líneas D+ y D- producen lactato a un ritmo significativamente más elevado que la línea ZB, sin embargo la diferencia entre estas dos no es significativa. En cambio cuando las células son mantenidas en presencia de tetraciclina, las células de la línea D+ presentan un ritmo de producción de lactato significativamente mayor ($48 \times 10^{-8} \text{ mM/cel.h}$) al de las células de las líneas ZB ($9.5 \times 10^{-8} \text{ mM/cel.h}$) y D- ($17.3 \times 10^{-8} \text{ mM/cel.h}$), concordante con lo observado para el consumo de glucosa. Por otro lado, la diferencia en la velocidad de producción de lactato entre las líneas D- y ZB, en presencia de tetraciclina, también es significativa. Esto es importante ya que sería una evidencia de que las líneas D- y ZB a pesar de ser muy similares en su fenotipo, presentan alguna diferencia en su metabolismo. De esta forma podemos decir que las tres líneas que componen el modelo presentan diferencias en su metabolismo luego de ser inducidas con tetraciclina. A continuación se resumen las velocidades específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato para las tres líneas en las dos condiciones.

Tabla 2. Velocidades de consumo de glucosa y producción de lactato para las tres líneas sin inducción. El error representa la desviación estándar de los triplicados experimentales. * corresponde a un p-valor ≤ 0.05 y ** a un p-valor ≤ 0.01 . Los test aplicados se realizaron comparando D+ o D- respecto a ZB

<i>SIN INDUCCIÓN</i>			
	ZB	D+	D-
<i>Velocidad de consumo de glucosa (10^{-8} mM/cel.h)</i>	7 ± 1	15 ± 3 *	15 ± 3 *
<i>Velocidad de producción de lactato (10^{-8} mM/cel.h)</i>	8.5 ± 0.8	24 ± 1 **	20.6 ± 0.8 **

Tabla 3. Velocidades de consumo de glucosa y producción de lactato para las tres líneas con inducción. El error representa la desviación estándar de los triplicados experimentales. * corresponde a un p-valor ≤ 0.05 y ** a un p-valor ≤ 0.01 . Los test aplicados se realizaron comparando D+ o D- respecto a ZB

<i>CON INDUCCIÓN (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tet)</i>			
	ZB	D+	D-
<i>Velocidad de consumo de glucosa ($10^{-8}\text{mM}/\text{cel.h}$)</i>	1.1 \pm 0.9	27 \pm 3 **	2.3 \pm 0.6
<i>Velocidad de producción de lactato ($10^{-8}\text{mM}/\text{cel.h}$)</i>	9.5 \pm 0.4	48 \pm 3 **	17.3 \pm 0.6 **

En conjunto estos resultados apuntan a que las células de la línea D+ presentan un metabolismo glucídico más acelerado en comparación con las células de las líneas ZB y D-. Esto es consistente con estudios de estas líneas celulares mediante ribosome profiling, realizadas en nuestro laboratorio y que muestran que las células de la línea D+ presentan aumentada la traducción de las enzimas de la vía glicolítica y las enzimas necesarias para la producción de lactato en comparación con las células de la línea ZB. En el anexo se muestran los resultados preliminares del ribosome profiling en forma de diagramas donde se presentan las enzimas que están aumentadas o disminuidas a nivel de traducción en las líneas D+ respecto a la ZB.

Para concluir, es importante discutir el efecto de la tetraciclina sobre el metabolismo celular. Existen numerosas investigaciones de hace algunos años, que muestran que la tetraciclina (o sus derivados como la doxiciclina) afecta el metabolismo y la proliferación de células humanas. Esto se debe a que la tetraciclina actúa sobre el ribosoma de las células procariontas y sobre el ribosoma mitocondrial. En una de estas investigaciones se muestra que el efecto de la doxiciclina en el metabolismo celular es dependiente de

la concentración del antibiótico y de la línea celular utilizada ⁵⁵. Sin embargo la investigación no es del todo concluyente, y se deberían realizar estudios complementarios. Por otro lado algunos artículos discuten los efectos de la tetraciclina en la mitocondria de las células humanas y sus consecuencias en el metabolismo de las mismas, atendiendo a las consecuencias del uso de este antibiótico en la investigación ^{56,57}. En conjunto, estas investigaciones proponen que la tetraciclina (o sus derivados) genera cambios en la expresión de las enzimas mitocondriales que alteran la respiración oxidativa, generando así una reconversión de las células hacia un fenotipo más glicolítico ⁵⁶. Cabe destacar que en el artículo citado en primer lugar, si bien no utilizan células de la línea MCF7, utilizan unas células de epitelio mamario no tumoral, las MCF10, aportando información aproximada de interés para esta investigación ⁵⁵. De todas formas, el efecto de la tetraciclina en la células en cultivo no invalida nuestros resultados ya que nuestro objetivo no es comparar el crecimiento celular entre las dos condiciones (con y sin inducción) sino que buscamos comparar el comportamiento celular de las líneas D+ y D- respecto a la línea control, la ZB, inducidas o sin inducir. En otras palabras, si la tetraciclina estuviera generando un efecto por sí misma (y no debido a la inducción de la expresión de MKL1) sobre las células de la línea D+, también deberíamos obtener un efecto semejante sobre las células de la línea ZB. Por lo tanto si expresamos los resultados de forma relativa (por ejemplo, D+ respecto a ZB), el efecto de la tetraciclina puede desestimarse. De todas formas, sería interesante conocer el efecto real sobre el metabolismo celular asociado por un lado a la tetraciclina y por otro lado al fenotipo de las distintas líneas del modelo. Para ello podría ser muy relevante realizar estudios en células MCF7 wild-type.

4.5. Efecto de la concentración de ligando en la eficiencia de transactivación del ER α endógeno en las tres líneas celulares

Para cumplir con el último objetivo propuesto para este trabajo, en el que se busca estudiar el efecto de la concentración de ligando natural 17 β -estradiol (E2) en la eficiencia de transactivación del ER α endógeno, se llevó a cabo un ensayo de genes reporteros. En el mismo, se cuantificó la actividad luciferasa como medida de la actividad del ER α actuando a través de la vía clásica de unión al ADN en los elementos ERE. Como se describe en los Métodos, para determinar la actividad de transactivación directa del ER α endógeno, se transfectaron las células con un vector conteniendo una construcción del gen de la luciferasa controlado por el promotor de la timidin-quinasa (tk) y un elemento de respuesta a estrógenos (ERE). Para normalizar los niveles de actividad luciferasa, además de agregar el plásmido ERE-tk-luc se cotransfecta, en todos los casos, con el plásmido pCMV SPORT- β gal.

Con este propósito, lo primero que hicimos fue amplificar los plásmidos conteniendo los genes reporteros (ERE-tk-luc y pCMV SPORT- β gal), transformando bacterias *E. coli* DH5 α competentes, mediante shock térmico. Posteriormente se realizó la extracción y purificación de dichos plásmidos a través de kits comerciales para extracción de ADN y luego se cuantificaron las preparaciones por absorbancia a 260 nm (tabla 4). También se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% para evaluar la calidad de las extracciones (figura 21).

Tabla 4. Plásmidos conteniendo los genes reporteros. Se transformaron E.coli DH5 α para la amplificación de los plásmidos. La extracción y purificación de los plásmidos fue realizada mediante kits comerciales.

<i>Plásmidos</i>	[] (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}
<i>ERE-tk-luc</i>	295,3	1,87
<i>pCMV SPORT-βgal</i>	470,0	1,91

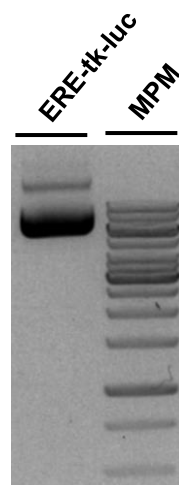


Figura 21. Análisis de la preparación de plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

Se sembró una alícuota de la preparación el plásmido ERE-tk-luc en un gel de agarosa 1%, junto con un marcador de peso molecular. El mismo se reveló con SYBR safe.

En segundo lugar se prepararon los cultivos celulares de las tres líneas como se describe en los Métodos. Brevemente, se sembró una placa de 24 pocillos por cada línea. Transcurridas 24 horas de incubación se retira el medio de todos los pocillos y se adiciona el medio de inducción con tetraciclina en todos los pocillos. En seguida se realiza la cotransfección de las células con los plásmidos ERE-tk-luc y pCMV SPORT- β gal. Transcurridas 48 horas de la inducción con tetraciclina, se retiró el medio de todos los pocillos y se agregó medio de inducción conteniendo distintas concentraciones de E2 o etanol como control, utilizando tres pocillos para cada dilución (triplicados). Al día siguiente se extrajo el medio y se agregó el Reporter Lysis Buffer (Promega) y se llevaron las placas a -80°C por al menos 1 hora (para favorecer la lisis).

Por último se realizaron las medidas de actividad luciferasa y beta galactosidasa. La primera se realizó por detección de luz emitida por la reacción enzimática utilizando el kit “Luciferase Assay System” (Promega) y un luminómetro (características). La segunda se realizó por detección de color, cuantificando la absorbancia a 405 nm con un lector de placas. El procedimiento completo se detalla en el apartado de Métodos. Este procedimiento (con excepción de la amplificación y purificación de los

plásmidos) fue utilizado para realizar cuatro experimentos independientes (cuadruplicados). En la figura 22A se grafica el “fold increase” promedio con su desviación estándar correspondiente para cada condición respecto a la concentración de ligando.

A su vez, para determinar si el efecto en la eficiencia de transactivación del receptor era en parte debido a una diferencia en la cantidad de receptor presente en las distintas líneas, realizamos un western blot utilizando un anticuerpo específico para receptor y otro para la β -tubulina para normalizar (figura 22B).

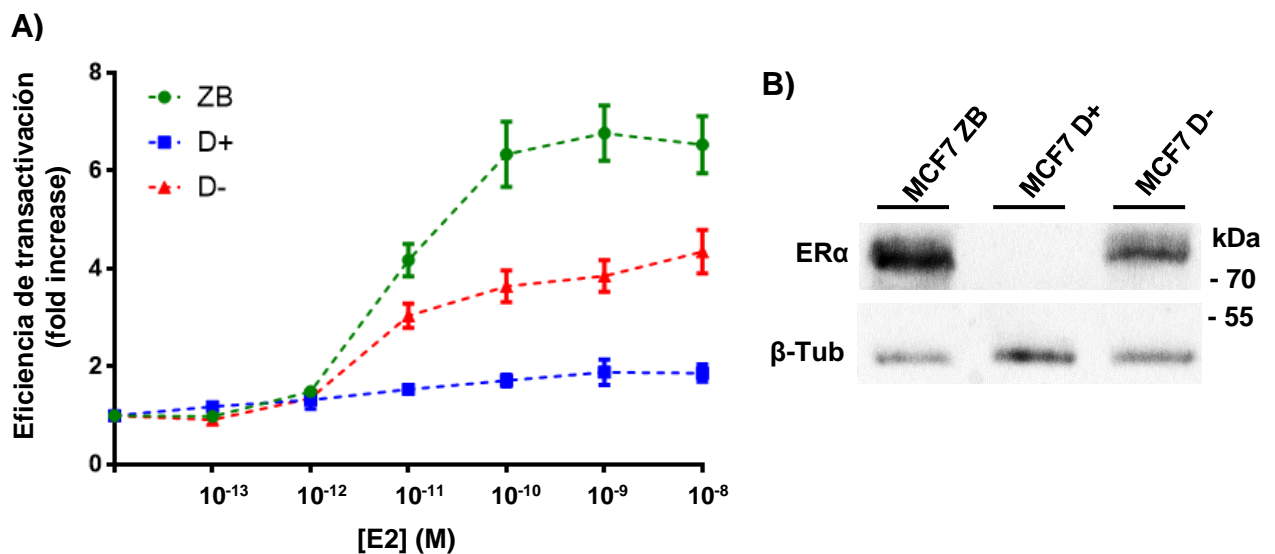


Figura 22. Efecto de la concentración de ligando en la eficiencia de transactivación del ER α endógeno en las tres líneas celulares.

A) La actividad transcripcional de ER α endógeno fue determinada empleando genes reporteros utilizando el gen de la luciferasa controlado por un promotor con un elemento ERE. Las tres líneas celulares fueron cotransfectadas con ERE-tk-luc (100 ng) y pCMV SPORT- β gal (100 ng). Luego de 24 hs de la transfección, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de E2 por otras 24 hs. Como control se utilizó EtOH (0). La actividad luciferasa fue normalizada respecto a la actividad galactosidasa y se expresa como “fold increase” en relación a los valores obtenidos con EtOH. Los valores corresponden a la media \pm SE obtenidos en cuatro experimentos independientes. **B)** Western blot para evaluar los niveles de expresión del ER α endógeno en las tres líneas celulares.

En primer lugar, en cuanto al efecto de la concentración del ligando en la eficiencia de transactivación (figura 22A), si bien se aprecia en las tres líneas, el efecto más claro lo observamos para la línea ZB en la que rápidamente se alcanza la saturación a concentraciones mayores a $10^{-10}M$.

Por otro lado, se obtuvo transactivación en las tres líneas cuando fueron tratadas con concentraciones de E2 mayores a $10^{-12}M$. De todas formas, vemos que existe una reducción en la actividad de transactivación en la línea D+, y en menor medida en la línea D-, cuando comparamos con los valores obtenidos en la línea ZB. La reducción en la transactivación en la línea D+ es muy importante y se aprecia como un leve aumento respecto al control cuando se tratan las células con concentraciones saturantes de E2. En la figura 22B, se muestra el resultado del western blot en el que se detecta la banda de 66 kDa del ER α endógeno, en cada una de las líneas celulares, una vez inducidas con tetraciclina. Tomando como referencia los niveles de β -tubulina, podemos concluir que el ER α se expresa de manera importante en las células ZB, en un nivel intermedio en las D- y en un nivel muy bajo (apenas detectado) en las D+. Por tanto, podríamos, en parte explicar la reducción en la actividad del ER α en las líneas D- y D+, por un descenso en los niveles de expresión del ER α en estas líneas. En el caso de la línea D-, sería una segunda evidencia de que a pesar de ser muy similar a la ZB, presenta algunas diferencias con la misma, en este caso la expresión y actividad del ER α .

Para cuantificar los niveles de ER α presentes en las líneas celulares, sería necesario repetir el western blot modificando las concentraciones y los tiempos de incubación de los anticuerpos. De todas formas, otros resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio muestran claramente que el receptor se expresa en niveles más bajos en la línea D+.

Por otro lado, otras investigaciones proponen que, sumado a la baja expresión del receptor, existen cambios en las propiedades del mismo que llevan a la disminución en su actividad en esta línea ⁴⁹.

En conjunto estos resultados obtenidos para las células D+ son congruentes con lo esperado para células que sufren un proceso de TEM, como la baja expresión y actividad del ER α , demostrado en diversas publicaciones ^{26,30,37}. Por otro lado, lo obtenido para la línea D- demuestra un fenotipo intermedio entre el fenotipo observado en D+ y el observado en ZB, siendo coherente con un estado de transición en un proceso de TME (transición mesenquimo-epitelial).

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el marco de esta tesina, nos propusimos como objetivo general profundizar el conocimiento de las tres líneas celulares que constituyen el modelo de transición epitelio-mesenquimal (ZB, D+ y D-).

En primer lugar, pusimos a punto un método que permite distinguir las tres líneas celulares de forma rápida por medio de un western blot. De esta forma, corroboramos la identidad de las tres líneas celulares con las que trabajamos.

En segundo lugar, estudiamos el crecimiento de las tres líneas celulares y vimos que en presencia de tetraciclina el crecimiento es levemente más lento que en ausencia de la misma. A su vez, el crecimiento de la línea ZB es algo mayor respecto a las otras dos líneas en las dos condiciones. Por otra parte, observamos que la inducción con tetraciclina produce un importante descenso en la viabilidad de la línea D+. Estas células son las que experimentan el proceso de transición epitelio-mesenquimal y tienden a adoptar un fenotipo con mayor capacidad de migración. Estos resultados serían coherentes con un proceso de muerte celular conocido como “anoikis” asociado al estrés sufrido por las células al desprenderse de la matriz extracelular. Este es un aspecto interesante en el contexto de la TEM que será abordado en futuras investigaciones.

En tercer lugar, las medidas de glucosa y lactato asociadas al crecimiento de las células muestran que las células D+ presentan un metabolismo glucídico más acelerado en comparación con las células de las líneas ZB y D-. Este resultado es consistente con estudios de estas líneas celulares mediante ribosome profiling, realizadas en nuestro laboratorio (resultados no publicados) que muestran que las células de la línea D+ presentan aumentada la traducción de las enzimas de la vía glicolítica y las enzimas

necesarias para la producción de lactato en comparación con las células de la línea ZB. Asimismo, los resultados del ribosome profiling, indicarían que las células de la línea D+ consumen mayores niveles de glutamina en comparación a las ZB. Este aspecto podría ser confirmado realizando un estudio semejante al realizado en este trabajo de determinación de la concentración de glutamina en los sobrenadantes. Finalmente, es interesante señalar que a la fecha existen algunas investigaciones acerca del efecto de la tetraciclina sobre el metabolismo de células humanas, donde se propone que la misma genera un cambio en la expresión de las enzimas mitocondriales alterando la respiración oxidativa, y produciendo así una reconversión de las células hacia un fenotipo más glicolítico. Por tal motivo, sería interesante estudiar el efecto real de la tetraciclina sobre el metabolismo celular de las distintas líneas del modelo. Para ello podría ser relevante realizar estudios con células MCF7 wild-type y compararlos con los resultados obtenidos para las líneas que componen el modelo.

En último lugar, los ensayos de transactivación del ER α endógeno mostraron una reducción muy importante en su actividad en la línea D+, y un poco menor en la línea D-, en comparación con la actividad en la línea ZB. Dicha reducción podría ser explicada en parte por la diferencia del nivel de expresión del ER en las tres líneas celulares, de acuerdo a lo observado mediante western blot, en este trabajo y en otros trabajos reportados por nuestro laboratorio. En conjunto, estos resultados tienen coherencia con lo descrito sobre los procesos de transición epitelio-mesenquimal y mesenquimo-epitelial, aportando información valiosa para la caracterización del modelo conformado por estas tres líneas.

El conjunto de los resultados aquí presentados constituyen una validación experimental de los datos obtenidos del ribosome profiling realizados en estas tres líneas celulares, y contribuyen con el mayor conocimiento de este

modelo de transición epitelio-mesenquimal. De esta manera el modelo celular adquiere mayor respaldo para abordar estudios de los cambios que se producen en la TEM, en el receptor de estrógenos y la resistencia al tratamiento en la progresión del cáncer de mama.

6. REFERENCIAS

1. Arnal, J.-F. *et al.* Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev.* **97**, 1045–1087 (2017).
2. Omoto, Y. & Iwase, H. Clinical significance of estrogen receptor β in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Sci.* **106**, 337–343 (2015).
3. Flach, K. D. & Zwart, W. The first decade of estrogen receptor cistromics in breast cancer. *J. Endocrinol.* **229**, R43–R56 (2016).
4. Cole, K., Taberero, M. & Anderson, K. S. Biologic characteristics of premalignant breast disease. *Cancer Biomark* **9**, 177–192 (2010).
5. Kerdivel, G. *et al.* Activation of the MKL1/actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* **390**, 34–44 (2014).
6. Inoue, S. & Horie-inoue, K. Estrogen Receptor Function and Molecular Mechanisms. **128**, 480–485 (2004).
7. Deroo, B. J. *et al.* Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 561–570 (2006).
8. Fisher, B., Redmond, C., Fisher, E. R. & Caplan, R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J. Clin. Oncol.* **6**, 1076–87 (1988).
9. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).
10. Sommer, S. & Fuqua, S. A. W. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* **11**, 339–352 (2001).

11. Bollig, A. & Miksicek, R. J. An estrogen receptor-alpha splicing variant mediates both positive and negative effects on gene transcription. *Mol Endocrinol* **14**, 634–649 (2000).
12. Krust, A. *et al.* The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* **5**, 891–897 (1986).
13. Lees, J. A., Fawell, S. E. & Parker, M. G. Identification of constitutive and steroid-dependent transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *J. Steroid Biochem.* **34**, 33–39 (1989).
14. Kumar, R. & Thompson, E. B. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* **64**, 310–319 (1999).
15. Ruff, M., Gangloff, M., Marie Wurtz, J. & Moras, D. Estrogen receptor transcription and transactivation Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res.* **2**, 353 (2000).
16. Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2905–2919 (2001).
17. Zwart, W. *et al.* The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J. Cell Sci.* **123**, 1253–1261 (2010).
18. Nettles, K. W. *et al.* Structural plasticity in the oestrogen receptor ligand-binding domain. *EMBO Rep.* **8**, 563–568 (2007).
19. Eiler, S., Gangloff, M., Duclaud, S., Moras, D. & Ruff, M. Overexpression, purification, and crystal structure of native era lbd. *Protein Expr. Purif.* **22**, 165–173 (2001).

20. Fernández-Calero, T., Cabrera-Cabrera, F., Ehrlich, R. & Marín, M. Silent Polymorphisms: Can the tRNA Population Explain Changes in Protein Properties? *Life* **6**, 9 (2016).
21. Moggs, J. G. & Orphanides, G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep.* **2**, 775–81 (2001).
22. Lin, C. Y. *et al.* Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet.* **3**, (2007).
23. Al Saleh, S., Al Mulla, F. & Luqmani, Y. A. Estrogen receptor silencing induces epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer cells. *PLoS One* **6**, (2011).
24. Desantis, C., Siegel, R., Bandi, P. & Jemal, A. Breast Cancer Statistics , 2011. *Cancer* **61**, 409–418 (2011).
25. Creighton, C. J., Chang, J. C. & Rosen, J. M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 253–260 (2010).
26. Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A. & Thiery, J. P. P. Emt: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
27. Voulgari, A. & Pintzas, A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1796**, 75–90 (2009).
28. Kourtidis, A., Lu, R., Pence, L. J. & Anastasiadis, P. Z. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp. Cell Res.* **358**, 78–85 (2017).
29. Scheel, C., Onder, T., Karnoub, A., Weinberg, R. A. & Talmadge, J. E. Adaptation versus selection: The origins of metastatic behavior. *Cancer Res.* **67**, 11476–11480 (2007).

30. Voutsadakis, I. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. *J. Clin. Med.* **5**, 11 (2016).
31. Voutsadakis, I. A. Ubiquitination and the Ubiquitin-Proteasome System as regulators of transcription and transcription factors in epithelial mesenchymal transition of cancer. *Tumour Biol.* **33**, 897–910 (2012).
32. Hyafil, F., Babinet, C. & Jacob, F. Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* **26**, 447–454 (1981).
33. Brown, R. L. *et al.* CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. **121**, (2011).
34. Zeisberg, M. & Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* **119**, 1429–1437 (2009).
35. Raymond, W. A. & Leong, A. S. -. Vimentin—a new prognostic parameter in breast carcinoma? *J. Pathol.* **158**, 107–114 (1989).
36. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
37. Liu, F., Gu, L. N., Shan, B. E., Geng, C. Z. & Sang, M. X. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update (review). *Oncol. Lett.* **12**, 4869–4876 (2016).
38. Harquail, J., Benzina, S. & Robichaud, G. A. MicroRNAs and breast cancer malignancy: An overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer Biomarkers* **11**, 269–280 (2012).

39. Scharenberg, M. A., Chiquet-Ehrismann, R. & Asparuhova, M. B. Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1911–1914 (2010).
40. Wang, D.-Z. *et al.* Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14855–60 (2002).
41. Miano, J. M. Serum response factor: Toggling between disparate programs of gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 577–593 (2003).
42. Sun, Q. *et al.* Defining the mammalian CArGome. *Genome Res.* **16**, 197–207 (2006).
43. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I. & Treisman, R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**, 329–342 (2003).
44. Cen, B. *et al.* Megakaryoblastic Leukemia 1 , a Potent Transcriptional Coactivator for Serum Response Factor (SRF), Is Required for Serum Induction of SRF Target Genes. **23**, 6597–6608 (2003).
45. Aravind, L. & Koonin, E. V. SAP - A putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 112–114 (2000).
46. Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B. & Treisman, R. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science (80-.).* **316**, 1749–1752 (2007).
47. Huet, G. *et al.* Repression of the estrogen receptor- α transcriptional activity by the Rho/megakaryoblastic leukemia 1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 33729–33739 (2009).

48. Flouriot, G. *et al.* The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications. *Biochem. J.* **461**, 257–268 (2014).
49. Fernández-Calero, T. *et al.* The transcriptional activities and cellular localization of the human estrogen receptor alpha are affected by the synonymous Ala87 mutation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **143**, 99–104 (2014).
50. Tzukerman, M. T. *et al.* Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.* **8**, 21–30 (1994).
51. Flouriot, G. *et al.* Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* **19**, 4688–4700 (2000).
52. Horjales, S. *et al.* Translational machinery and protein folding: Evidence of conformational variants of the estrogen receptor alpha. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**, 139–143 (2007).
53. Zhang, X., Wen, Y. & Yang, S. T. Modes of Culture/Animal Cells. in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* **1**, 285–302 (Elsevier, 2011).
54. Fernández-calero, T., Flouriot, G. & Marín, M. The Synonymous Ala87 Mutation of Estrogen Receptor Alpha Modifies Transcriptional Activation Through Both ERE and AP1 Sites. *Estrogen Receptors.* **1366**, 287–296 (2016).
55. Ahler, E. *et al.* Doxycycline Alters Metabolism and Proliferation of Human Cell Lines. *PLoS One* **8**, 8–14 (2013).

56. Chatzisprou, I. A., Held, N. M., Mouchiroud, L., Auwerx, J. & Houtkooper, R. H. Tetracycline antibiotics impair mitochondrial function and its experimental use confounds research. *Cancer Res.* **75**, 4446–4449 (2015).
57. Wang, X., Ryu, D., Houtkooper, R. H. & Auwerx, J. Antibiotic use and abuse: A threat to mitochondria and chloroplasts with impact on research, health, and environment. *BioEssays* **37**, 1045–1053 (2015).

7. ANEXO

7.1. Resultados preliminares obtenidos por Ribosome Profiling

En la figura 23 se muestran los resultados preliminares recientes (aún sin publicar) de los ensayos de Ribosome Profiling obtenidos por Tamara Fernández e ilustrados en forma de ciclos por Ricardo Ehrlich. Se busca mostrar las enzimas que se encuentra aumentadas (rojo), disminuidas (verde) o que se mantiene (violeta) el nivel de traducción (de acuerdo a la cantidad ribosomas traduciendo los ARNm de estas enzimas) en la línea D+ con respecto al nivel de traducción en la línea ZB.

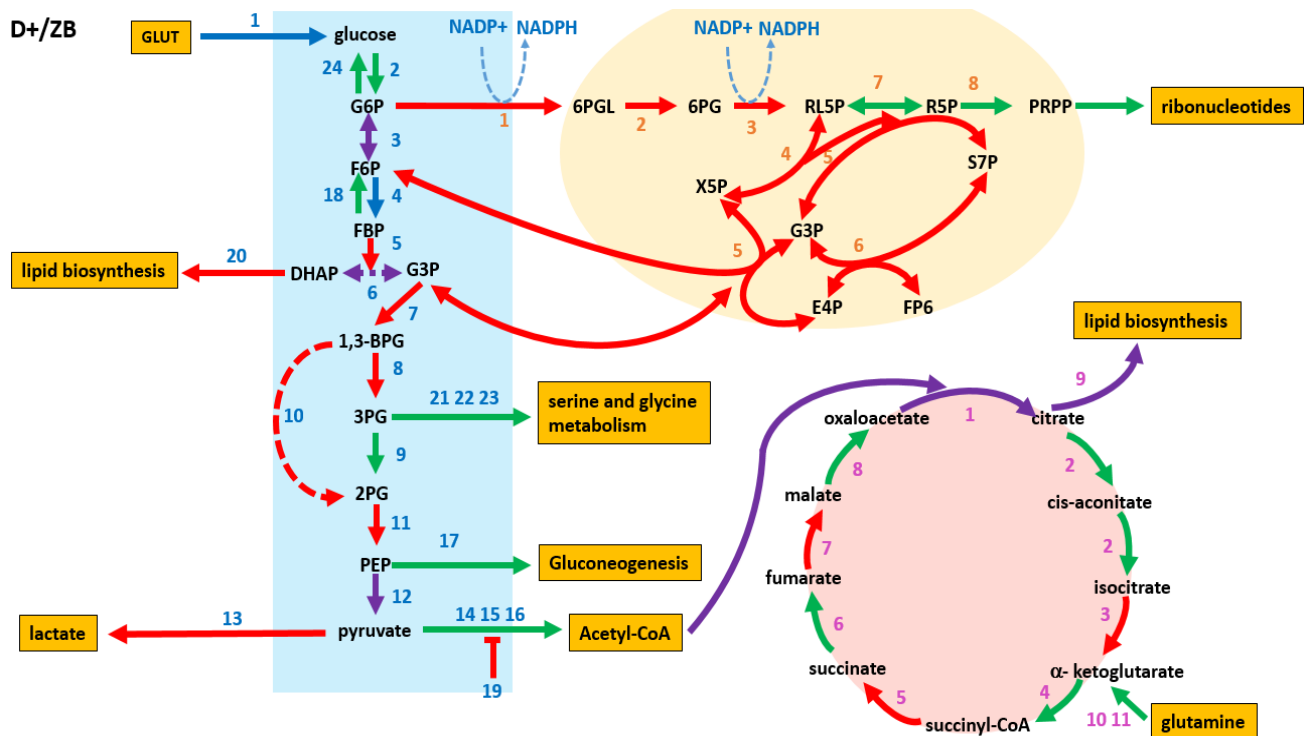


Figura 23. Esquema global donde se muestran los cambios en el nivel de traducción de las enzimas de la glicólisis, el ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato.

Rectángulo celeste: glicólisis; óvalo anaranjado: vía de las pentosas fosfato; círculo rosa: ciclo de Krebs. Los colores de las flechas indican los cambios en los niveles de traducción en D+ respecto a ZB: rojo, verde y violeta corresponden al aumento, descenso o ausencia de cambio significativo respectivamente. Los números en el esquema corresponden a las siguientes enzimas:

Glucólisis

- 1) Transportadores de glucosa (GLUT)
- 2) Hexoquinasa
- 3) Fosfoglucosa isomerasa
- 4) Fosfofructoquinasa
- 5) Fructosa-bifosfato aldolasa
- 6) Trifosfato isomerasa
- 7) Gliceraldeido 3 fosfato deshidrogenasa
- 8) Fosfoglicerato quinasa
- 9) Fosfoglicerato mutasa
- 10) Inositol-polifosfato fosfatasa 1 (MINPP 1)/ 2,3-bifosfoglicerato fosfatasa
- 11) Fosfoglicerato mutasa
- 12) Piruvato quinasa
- 13) Lactato deshidrogenasa
- 14) Piruvato deshidrogenasa subunidad E1 alpha
- 15) Dihidrolipoamida deshidrogenasa
- 16) Piruvato deshidrogenasa subunidad E2 (dihidrolipoamida acetiltransferasa)
- 17) Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
- 18) Fructosa 1-6-bifosfatasa 1
- 19) Piruvato dehidrogenasa quinasa
- 20) Dihidroacetona quinasa
- 21) Fosfoglicerato deshidrogenasa
- 22) Fosfoserina aminotransferasa
- 23) Fosfoserina fosfatasa
- 24) Glucosa-6-fosfatasa

Ciclo de Krebs

- 1) Citrato sintasa
- 2) Aconitato hidratasa
- 3) Isocitrato deshidrogenasa
- 4) 2-oxoglutarato deshidrogenasa
- 5) Dihidrolipoamida S-succinil transferase + succinil-CoA sintetasa
- 6) Succinato deshidrogenasa
- 7) Fumarato hidratasa
- 8) Malato deshidrogenasa
- 9) ATP citrato liasa
- 10) Glutaminasa
- 11) Glutamato deshidrogenasa

Vía de las pentosas fosfato

- 1) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- 2) 6-fosfoglucolactonasa
- 3) 6-fosfogluconactato deshidrogenasa
- 4) Ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa
- 5) Transcetolasa
- 6) Transaldolasa
- 7) Ribosa 5-fosfato isomerasa A
- 8) Fosforibosil pirofosfato sintasa

7.2. Soluciones

Buffer Fosfato Salino (PBS) solución stock 10X (pH~7,3)

80 g NaCl (137 mM)
2 g KCl (2,7 mM)
2 g KH_2PO_4 2 g (1,4 mM)
11,5 g Na_2HPO_4 (4 mM)
Llevar a 1 L con H_2O mφ

Buffer carga proteínas "Laemmli Sample Buffer" (6X)

SDS – 4%
Glicerol – 20%
Tris – Cl (pH 6.8) – 120 mM
Azul de bromofenol – 0.02%
DTT – 30 mM

Buffer de corrida geles poliacrilamida, Tris-glicina, Stock 10X

125 mM Tris
1,25 M Glicina
0,5% SDS

Buffer de transferencia de proteínas

25mM Tris – HCl pH 8,3
150mM Glicina
0.037% SDS
20% EtOH

TBST

Tris – HCl pH 7.5 – 10 mM
Tween 20 – 0.1%
NaCl – 75 mM

Solución de bloqueo para western blot (TBST-5% leche)

2,5 g leche en polvo

50 mL TBST

TAE (Tris- Acético- EDTA) Stock 50X para 1 litro.

242 g Tris base

57,1 mL de ácido acético glacial

100 mL de EDTA 0,5 mM pH 8

LB

10g triptona

5 g extracto de levadura

5 g NaCl por litro.

Autoclavado

LB-Agar

10g triptona

5 g extracto de levadura

5 g NaCl por litro.

15 g Agar por litro

Autoclavado

Reactivos para el ensayo de β -galactosidasa

Buffer fosfato 0,1 M pH 7,3:

5,82 g Na_2HPO_4

1,24 g NaH_2PO_4

H₂O c. s. p. 500 mL

Almacenar a 4°C

ONPG 4 mg/mL

250 mg *O* – nitrofenil – beta – D – galactopiranosido (ONPG)

250 mL Buffer fosfato 0,1 M pH 7,3

Almacenar a – 20 °C

β -mercaptoetanol-MgCl₂ 100X

0,2 g MgCl₂

3,19 mL β – mercaptoetanol

H₂O c. s. p. 10 mL

Almacenar a 4°C

Mix para el ensayo de β -galactosidasa para 1 punto de medida mezclar:

142 μ L de buffer fosfato 0,1 M pH 7,3

2.5 μ L de β – mercaptoetanol – MgCl₂ 100X

55 μ L de ONPG 4 mg/mL.

7.3. Marcadores de peso molecular

a) Marcadores de peso molecular para ADN

El marcador de PM utilizado en las electroforesis en gel de agarosa corresponde a GeneRuler 1kb DNA Ladder de Thermo Scientific.

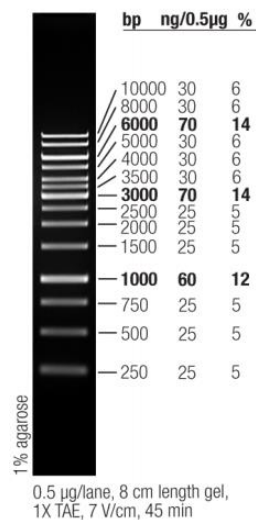


Figura 24. Marcadores de PM para ADN

GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific (Cat #: SM0311)

b) Marcadores de peso molecular para proteínas

Los marcadores de PM utilizados en las electroforesis en geles de poliacrilamida fueron los marcadores preteñidos: PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific (#26616) y Prestained Protein Marker Broad Range (7-175 kDa) Biolabs (P7708S).

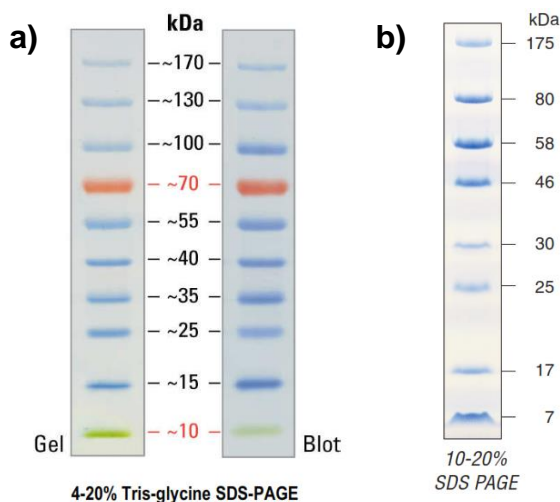


Figura 25. Marcadores de PM para proteínas

a) PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific (#26616) **b)** Prestained Protein Marker Broad Range (7-175 kDa) Biolabs (P7708S).

7.4. Vectores

pCMV SPORT- β Gal - Vector de expresión constitutiva de la β -Galactosidasa, utilizado para normalización

