

Fernandez, Eugenia¹; Ubillos, Luis²; Elgul, Nabila³; Festari, María Florencia⁴; Mazal, Daniel⁵; Pritsch, Otto^{4,6}; Alonso, Isabel³; Osinaga, Eduardo^{1,4}; Berois, Nora¹

1 Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral, Institut Pasteur de Montevideo.
 2 Servicio de Oncología Clínica, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República.
 3 CASMU, Centro Asistencial del Sindicato Médico del Uruguay.
 4 Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

5 Centro Hospitalario Pereira Rossell, Departamento de Anatomía Patológica y Citología del Hospital de la Mujer.
 6 Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo.

Introducción

El cáncer de mama es el más frecuente en la mujer y el quinto en mortalidad a nivel mundial. La O-glicosilación aberrante se asocia comúnmente a cáncer y las polipéptido-GalNAc-transferasas (GalNAc-Ts) son glicosiltransferasas consideradas biomarcadores emergentes para esta enfermedad. GalNAc-T13 se ha correlacionado con agresividad en algunos tumores, planteándose como hipótesis su utilidad como biomarcador en cáncer de mama.

Metodología

Se evaluó la expresión de GalNAc-T13 a nivel de ARNm y proteína en 6 líneas celulares de cáncer de mama humano (RT-NESTED-PCR, RT-Real Time-PCR; inmunocitoquímica). Se estudió la expresión de esta enzima por inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal T13.5 en 338 tumores primarios de mama y 48 ganglios linfáticos metastásicos pareados, evaluando la correlación de la expresión de GalNAc-T13 con las características clínicas y la supervivencia de los pacientes. Se analizaron datos de glicosilación in vitro de un panel de 180 péptidos sintéticos obtenidos previamente para identificar posibles sustratos peptídicos aceptores de GalNAc-T13 que puedan estar implicados en la biología del cáncer de mama.

Resultados

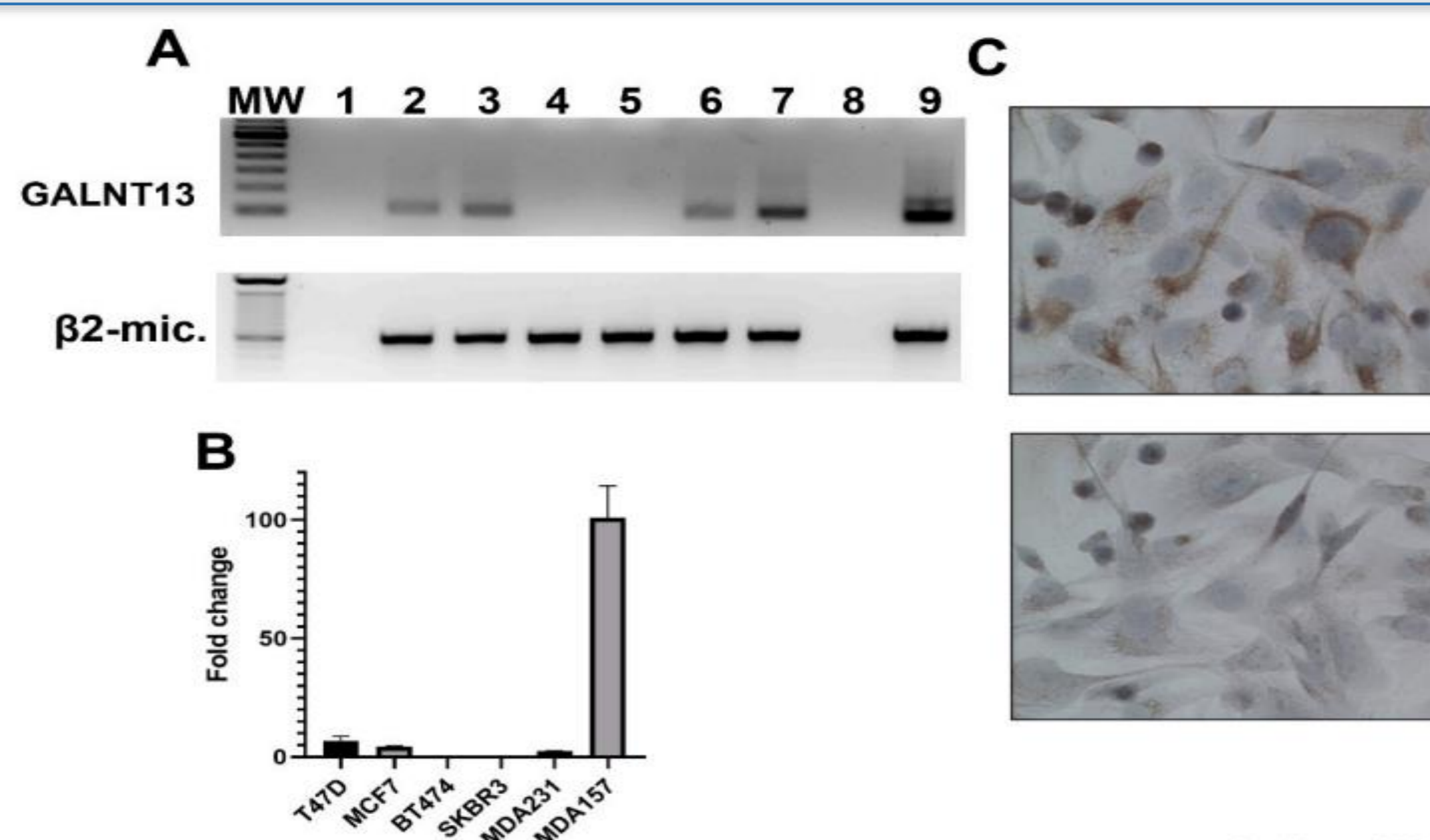


Figura 1. GalNAc-T13 se expresa en líneas de cáncer de mama humano (A) Nested-RT-PCR amplificando un fragmento de ARNm de GalNAc-T13 y RT-PCR amplificando un fragmento de β 2- microglobulina como control de calidad del ADNc.; MW, DNA ladder 100 pb (Thermo Fischer); 1, control negativo de master-mix; 2, T47D; 3, MCF7; 4, BT474; 5, SKBR3; 6, MDA-MB-231; 7, MDA-MB-157; 8, agua ultrapura libre de ARNasas como control negativo; 9, HeLa como control positivo. (B) real-time PCR cuantitativa para las mismas líneas celulares de cáncer de mama. (C) Inmunocitoquímica evaluando la expresión de GalNAc-T13 a nivel de proteína en la línea celular MDA-MB-157 en la imagen superior, control negativo en imagen inferior (aumento de 40X).

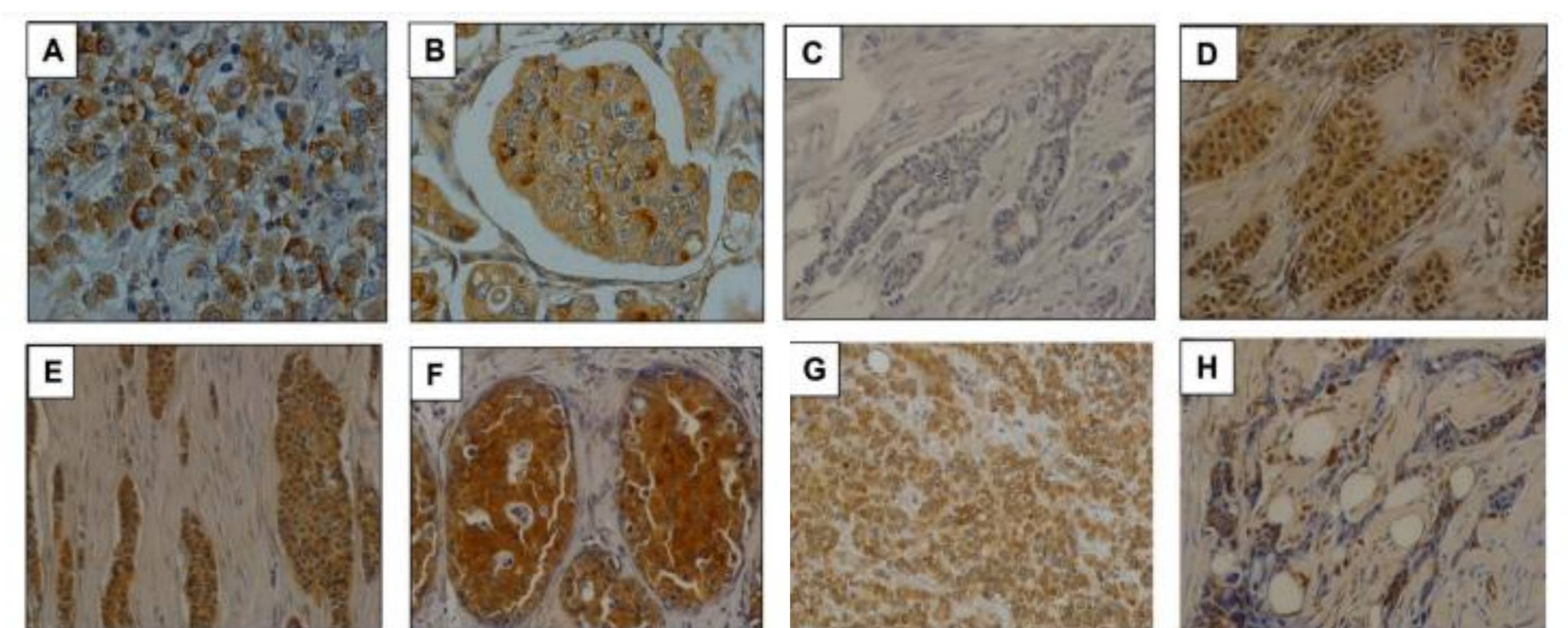


Figura 2: 43,8% de los tumores analizados mostró expresión de GalNAc-T13. A,B) Inmunotinción de T13.5 (anti-GalNAc-T13) que muestra patrón citoplasmático difuso y granular, con refuerzos perinucleares típicos de marcado del aparato de Golgi. (C-F) Ejemplos de intensidad del inmunomarcado: (-), (+), (++) y (+++), respectivamente. (G) Inmunomarcado en alto porcentaje de células. (H) Inmunomarcado focal en bajo porcentaje de células. A y B fueron tomadas con un aumento de 400x. C-H fueron tomadas con un aumento de 200x

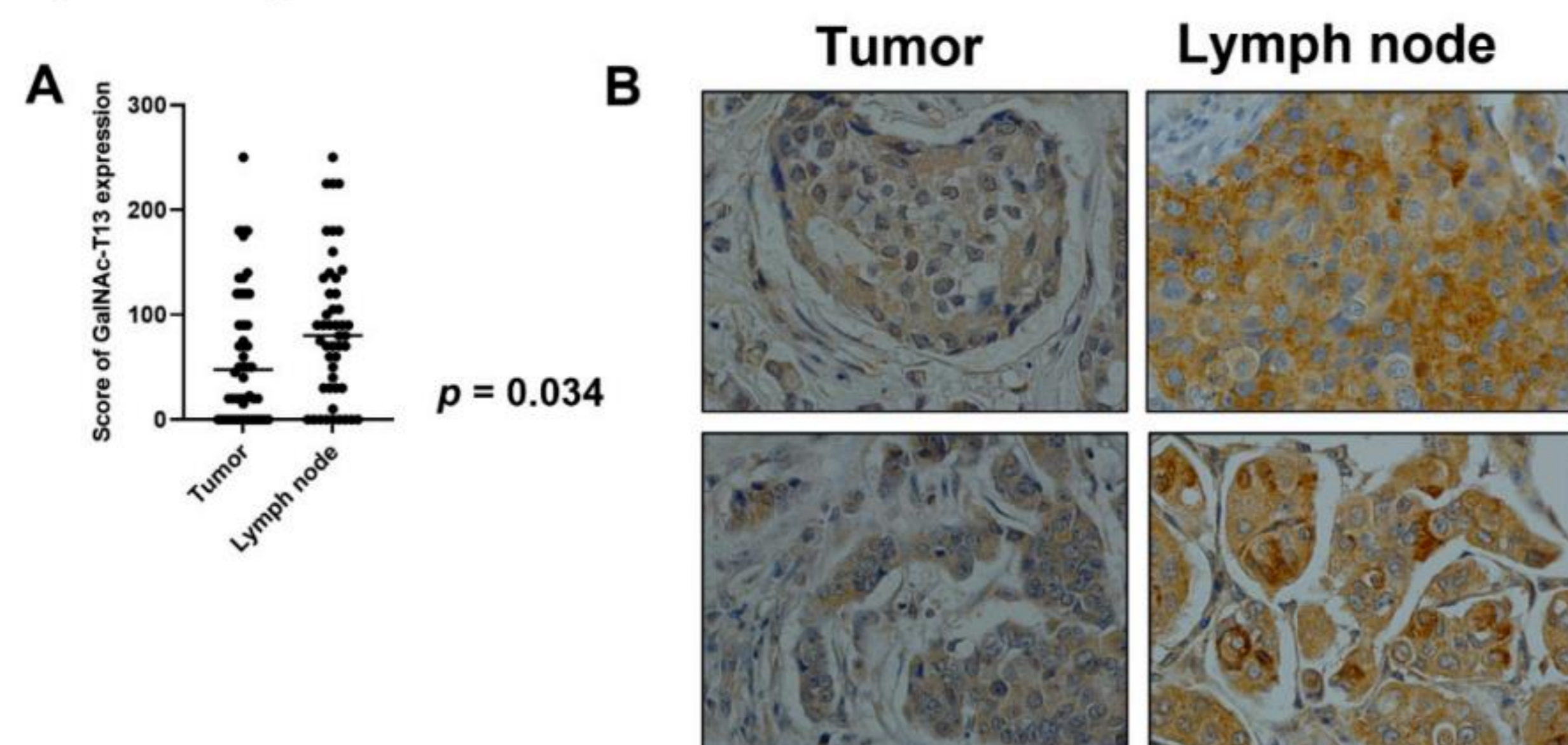


Figura 3: La Expresión de GalNAc-T13 es significativamente mayor en los ganglios linfáticos metastásicos en comparación con los tumores primarios respectivos. (A) Comparación de la expresión media de GalNAc-T13 por tumores primarios y ganglios linfáticos metastásicos ($p = 0,034$). (B) Inmunotinción de GalNAc-T13 en tumor primario y correspondiente metástasis en ganglio linfático. Ampliación de imágenes 400X.

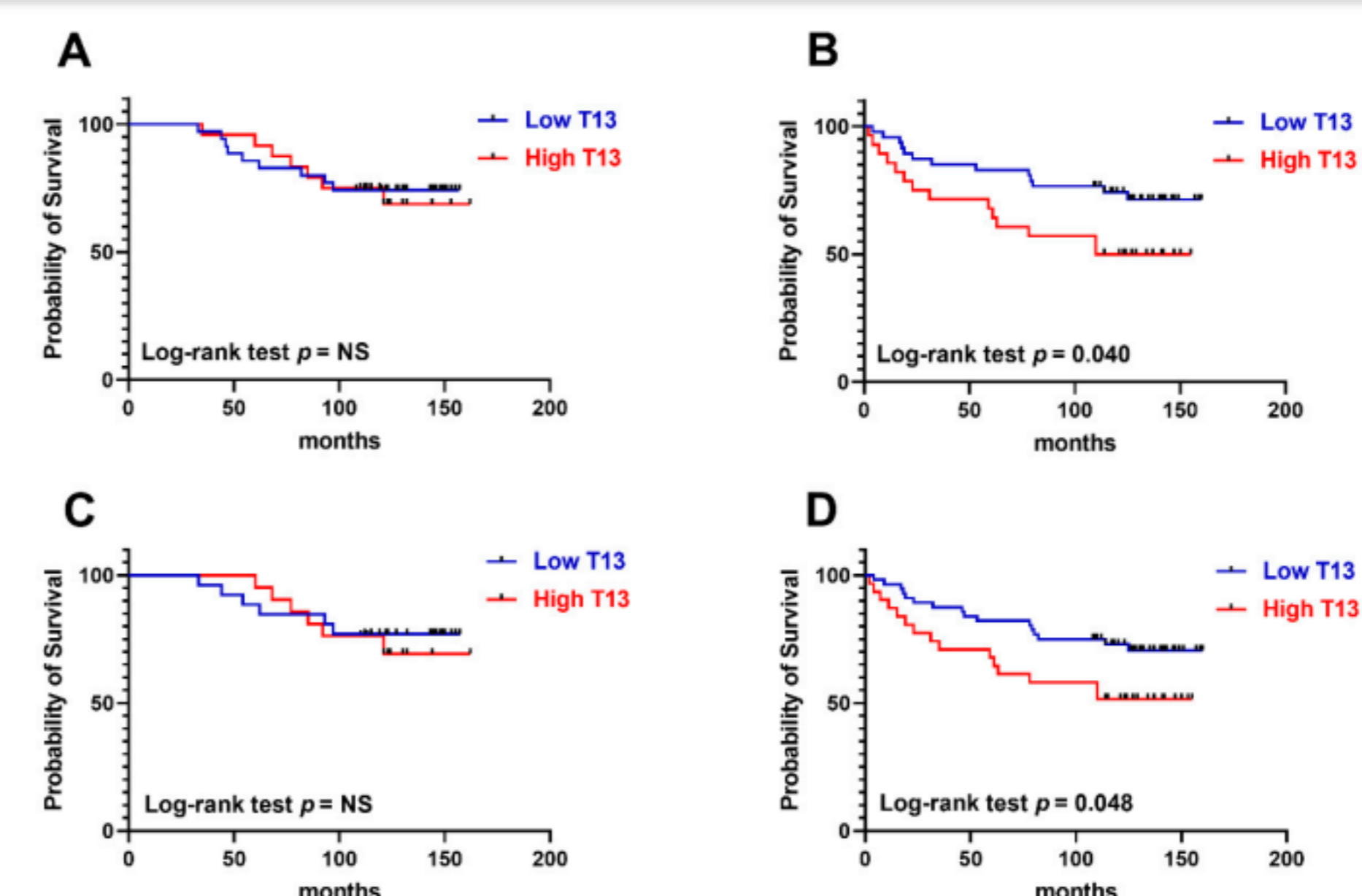


Figura 4: GalNAc-T13 se correlaciona con menor supervivencia global en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad y en pacientes con ganglios linfáticos metastásicos. (A) Tumores en estadios tempranos (I y IIA) ($n = 59$). (B) Tumores en estadio avanzado (IIB y III) ($n = 75$). (C) Pacientes sin afectación de los ganglios linfáticos ($n = 47$). (D) Pacientes con ganglios linfáticos metastásicos ($n = 87$)

Tabla 1: Posibles Sustratos aceptores de GalNAcT13

Péptido	Papel en cáncer de mama/ ¿Glicosilación?	Referencias
Anexina 1 (ANXA1)	-A pesar de ciertas discrepancias en la bibliografía, ANXA1 fue sugerido como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama, sobre todo en tumores triple negativos. como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama, sobre todo en tumores triple negativos. -ANXA1 puede tener un efecto en el microambiente tumoral, que favorecería al crecimiento del tumor de mama.	de Graauw M. Et al., 2010: doi:10.1073/pnas.0913360107; Bhardwaj A. Et al., 2015: doi:10.1371/journal.pone.0127678; Kang H, Ko J y Jang SW. 2012: doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.114; Bist P. Et al., 2011: doi:10.1038/onc.2011.28; Sobral-Lite M. Et al., 2015: doi:10.1186/s12916-015-0392-4; Silva-Oliveira R. Et al., 2020: doi:10.3390/jm9123911; Bai F. Et al., 2020: doi:10.1136/jtc-2019-000169; Moraes LA, Ampomah PB, Lim LHK, 2018: doi:10.1080/19336918.2018.1486143
Apolipoproteína E (APOE)	-El impacto de la expresión de APOE depende de la localización (suero o tumor): APO E circulante asociada con la agresividad; APO E en tumores correlación negativa con desarrollo tumoral -Diversos sitios de O-glicosilación (puede variar con ubicación): consecuencias funcionales.	Zhou Y, Luo G, 2020: doi:10.1007/s12094-020-02354-2; Huang ZH, Gu DS, Marzone T, 2004: doi:10.1074/jbc.M402631200; Flowers SA. Et al., 2020: doi:10.1093/glycob/cwz084; Kacperczyk M, Kmiecik A, Kratz EM, 2021: doi:10.3390/jms2137197
Endoplasmina (GRP94)	-Sobrexpresión de GRP94 se asocia con peor pronóstico en cáncer de mama. -Relevancia de expresión en membrana en cáncer -Relevancia de la glicosilación en el efecto funcional de GRP94.	Liu S. Et al., 2018: PMID: 31938432; Buc Calderon P, Sennehael AL, Glorieux C. 2018: doi:10.1016/j.biopha.2018.05.106; Li X, Et al., 2015: doi:10.1002/jgc.29405; Yan P. Et al., 2020: doi:10.1016/j.celrep.2020.107840
Factor V	-Sobrexpresión en cáncer de mama, especialmente en subtipos más agresivos y altamente proliferativos -Tumores basales relación con mejor supervivencia global: -Proteína altamente glicosilada (tanto N- como O-glicanos), principalmente en dominio B - Rol importante en regulación de la activación y función de FV -Mayoría de los O-glicanos estructura basada en core-1 y glicofomas más diversificadas en la Thr805 (residuo incluido en secuencia glicosilada por GalNAc-T13)	Ma C. Et al., 2020: doi:10.1111/jth.14861; Tinholt M. Et al., 2018: doi:10.1111/jth.14151; Tinholt M. Et al., 2020: doi:10.1080/2162402X.2020.1824644
Frizzled 6 (FZD6)	-Sobrexpresión asociada a peor pronóstico en cáncer de mama -Nota: relacionada también con la quimiorresistencia en neuroblastoma, y proliferación de células pulmonares (tumores dónde expresión de GalNAc-T13 se correlaciona con agresividad)	Corda G, Sala A, 2017: doi:10.1038/oncsis.2017.69; Corda G, Et al., 2017: doi:10.1002/path.4841; Zeng CM, Chen Z, Fu L, 2018: doi:10.3390/jms19051543
carboxipeptidasa-D (CPD)	-Expresión aumentada se asocia a peor pronóstico en cáncer mamario. -Altamente glicosilada- Esto puede afectar propiedades y funcionalidad de la proteína	Abdelmagid SA, Tao CKL, 2008: doi:10.1210/en.2008-0145; Goettig P, 2016: doi:10.3390/jms17121969; Thomas LN, Et al., 2017: doi:10.1007/s10549-017-4223-7; MacDonald TM, Et al., 2020: PMID: 32509382
Neuroregulina 3 (NRG3)	-Expresión aumentada tanto en carcinoma in situ como en carcinomas invasivos de mama. -Se ha sugerido como un biomarcador predictivo para terapias dirigidas. -Múltiples sitios de O-glicosilación y distintas variantes de splicing.	Hijazi MM, Et al., 1998: doi:10.3892/jco.13.5.1061; Dunn M, Et al., 2004: doi:10.1002/path.1561; Marshall C, Et al., 2006: doi:10.1007/s10549-005-9073-z; Ocaña A, Et al., 2016: doi:10.18632/oncotarget.8648; Hayes NVL, Gullick WJ, 2008: doi:10.1007/s10911-008-9078-4

Conclusiones y Perspectivas

Logramos demostrar la expresión de GalNAc-T13 en líneas celulares y tumores de mama. Además, encontramos que GalNAc-T13 tuvo mayor expresión en los ganglios linfáticos metastásicos en comparación con los tumores de mama primarios respectivos. Este marcador se correlacionó con mala evolución clínica en pacientes con este tipo de cáncer, lo que sugiere que esta enzima podría ser un nuevo biomarcador de subtipos de cáncer de mama más agresivos y un candidato potencial para tratamientos dirigidos. A su vez, identificamos 8 péptidos candidatos como posibles aceptores de GalNAc-T13 y nos encontramos evaluando los mecanismos moleculares implicados en el papel de GalNAc-T13 en la biología del cáncer de mama.