

# GaINAc-T13 como biomarcador de agresividad en cáncer humano: avances en tumores de mama, cuello uterino y pulmón

Fernandez, Eugenia<sup>1,2</sup>; Santana, Diego<sup>2</sup>; Carrasco, Mariana<sup>2</sup>; Ubillos, Luis<sup>3</sup>; Elgul, Nabila<sup>4</sup>; Mazal, Daniel<sup>5</sup>; Acosta, Marcos<sup>2</sup>; Touya, Diego<sup>2</sup>; Alonso, Isabel<sup>4</sup>; Serrano, Ma. José<sup>6</sup>; Osinaga, Eduardo<sup>1,2</sup>; Berois, Nora<sup>1,2</sup>

1 Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral, Institut Pasteur de Montevideo.

2 Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Oncología, Hospital Maciel (ASSE).

3 Servicio de Oncología Clínica, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

4 CASMU, Centro Asistencial del Sindicato Médico del Uruguay

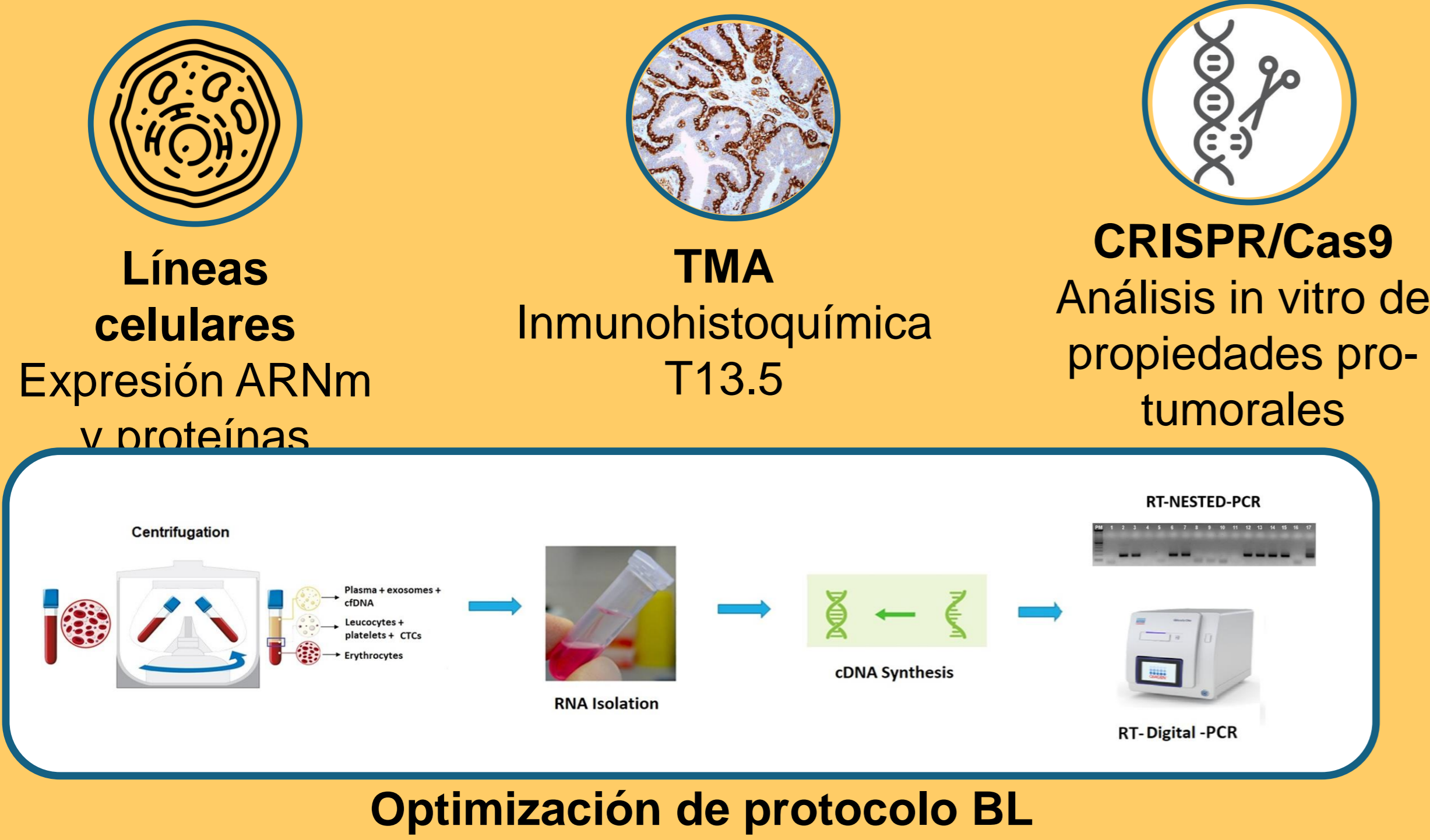
5 Centro Hospitalario Pereira Rossell, Departamento de Anatomía Patológica y Citología del Hospital de la Mujer.

6 Laboratorio de Biopsia Líquida e intercepción del cáncer, GENYO, Granada, España.

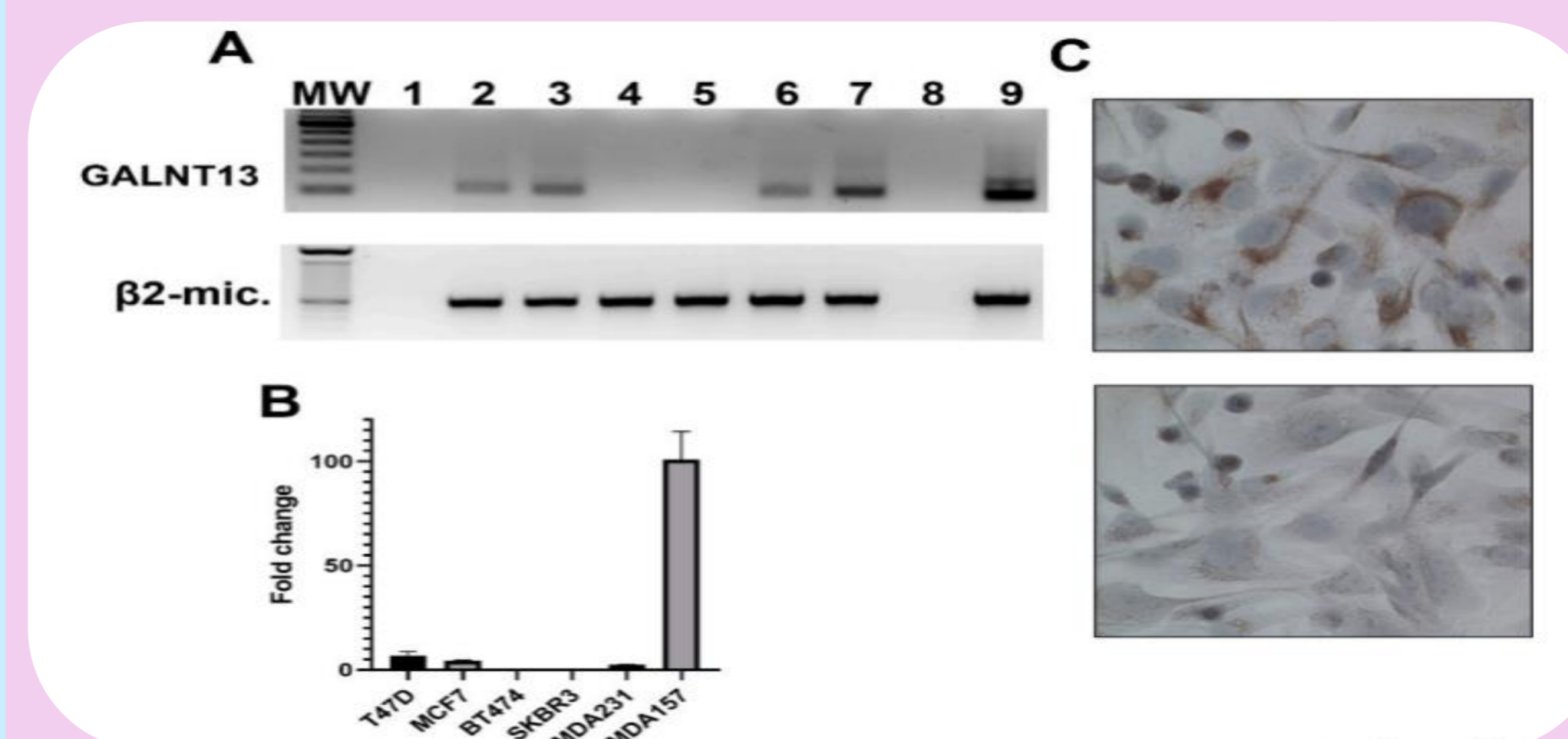
## INTRODUCCIÓN

La O-glicosilación aberrante se asocia comúnmente a cáncer y las polipéptido-GaINAc-transferasas (GaINAc-Ts) son glicosiltransferasas consideradas biomarcadores emergentes para esta enfermedad. GaINAc-T13 se ha correlacionado con el comportamiento biológico en algunos tumores, planteándose su posible utilidad como biomarcador también en cáncer de mama, pulmón y/o cuello uterino. La biopsia líquida emerge como alternativa no invasiva para diagnóstico cuando el tejido no es accesible, así como de utilidad para seguimiento y monitorización de los tratamientos. Por lo anterior, planteamos como hipótesis la utilidad del desarrollo de un procedimiento de biopsia líquida para cáncer de pulmón.

## METODOLOGÍA

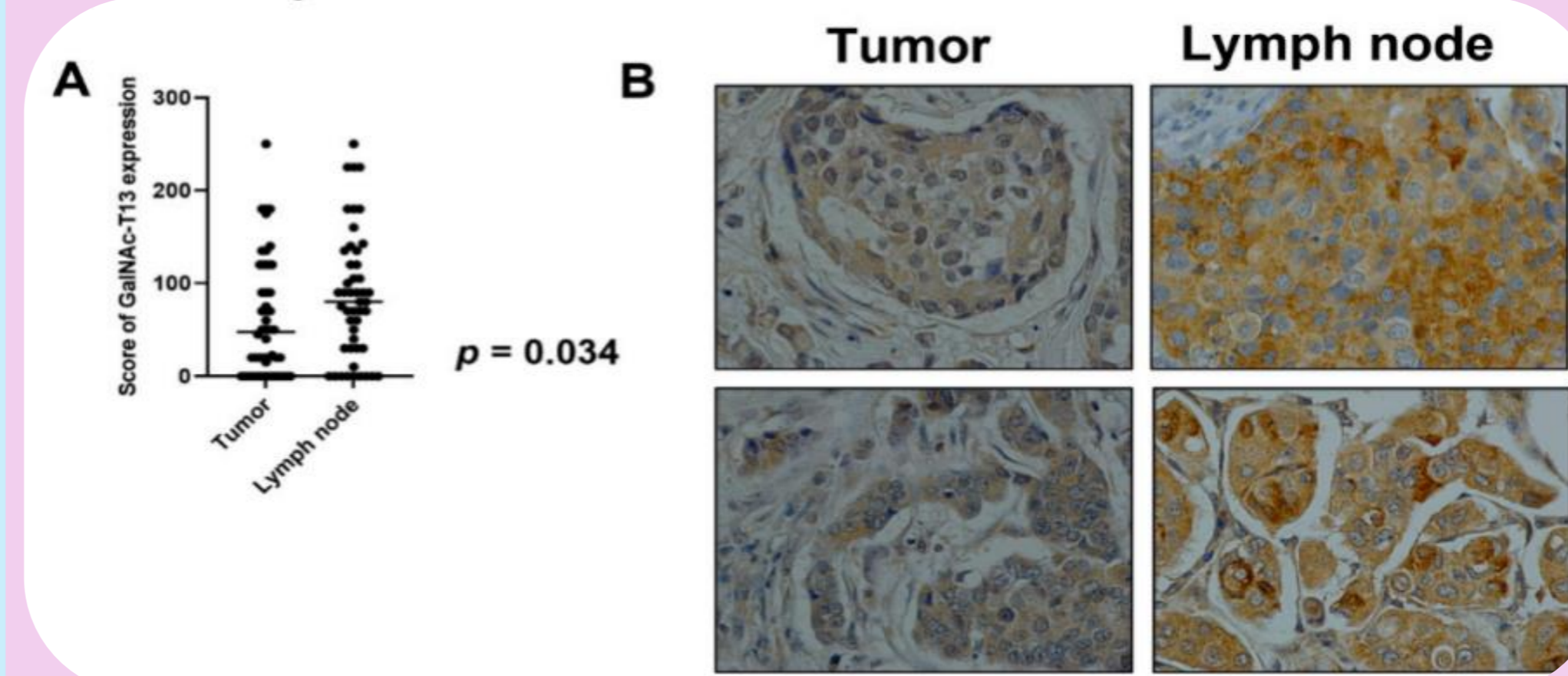


## RESULTADOS



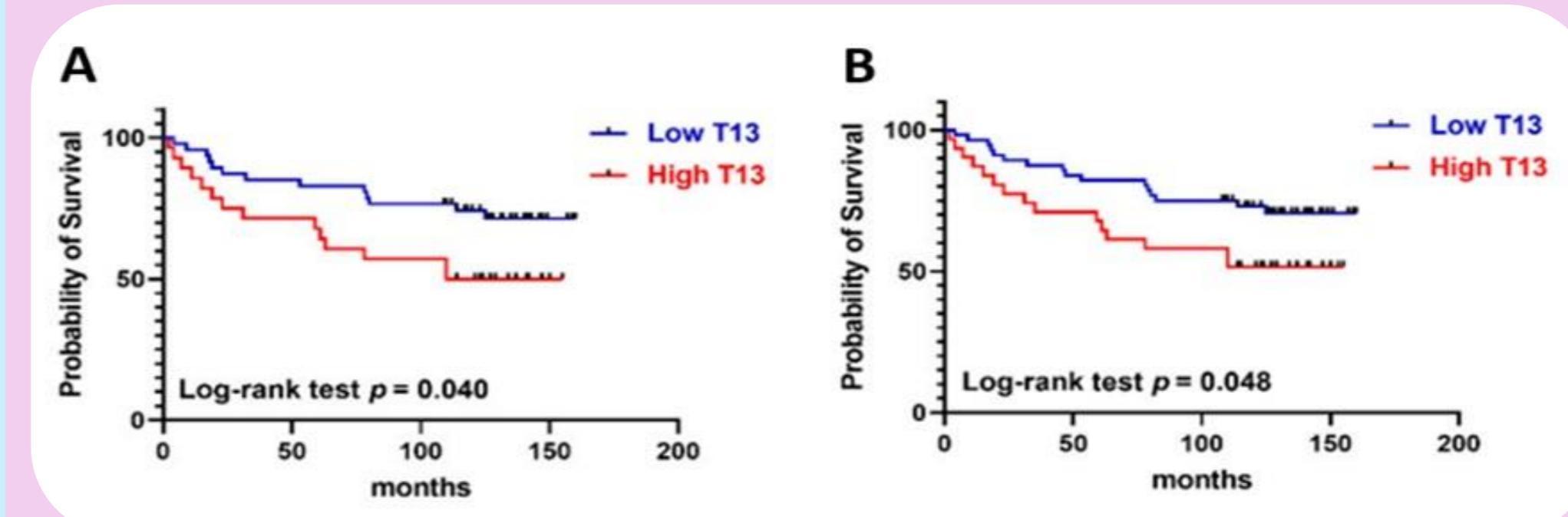
**Figura 1. GaINAc-T13 se expresa en líneas de cáncer de mama humano**

(A) Nested-RT-PCR amplificando ARNm de GALNT13 y RT-PCR amplificando  $\beta$ 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, control negativo; 9, Hela como control positivo. (B) RT-real-timePCR para las mismas líneas celulares de cáncer de mama. (C) Inmunohistoquímica evaluando expresión de GaINAc-T13 a nivel de proteína en MDA-MB-157 (imagen superior), control negativo (imagen inferior). Aumento 40X.



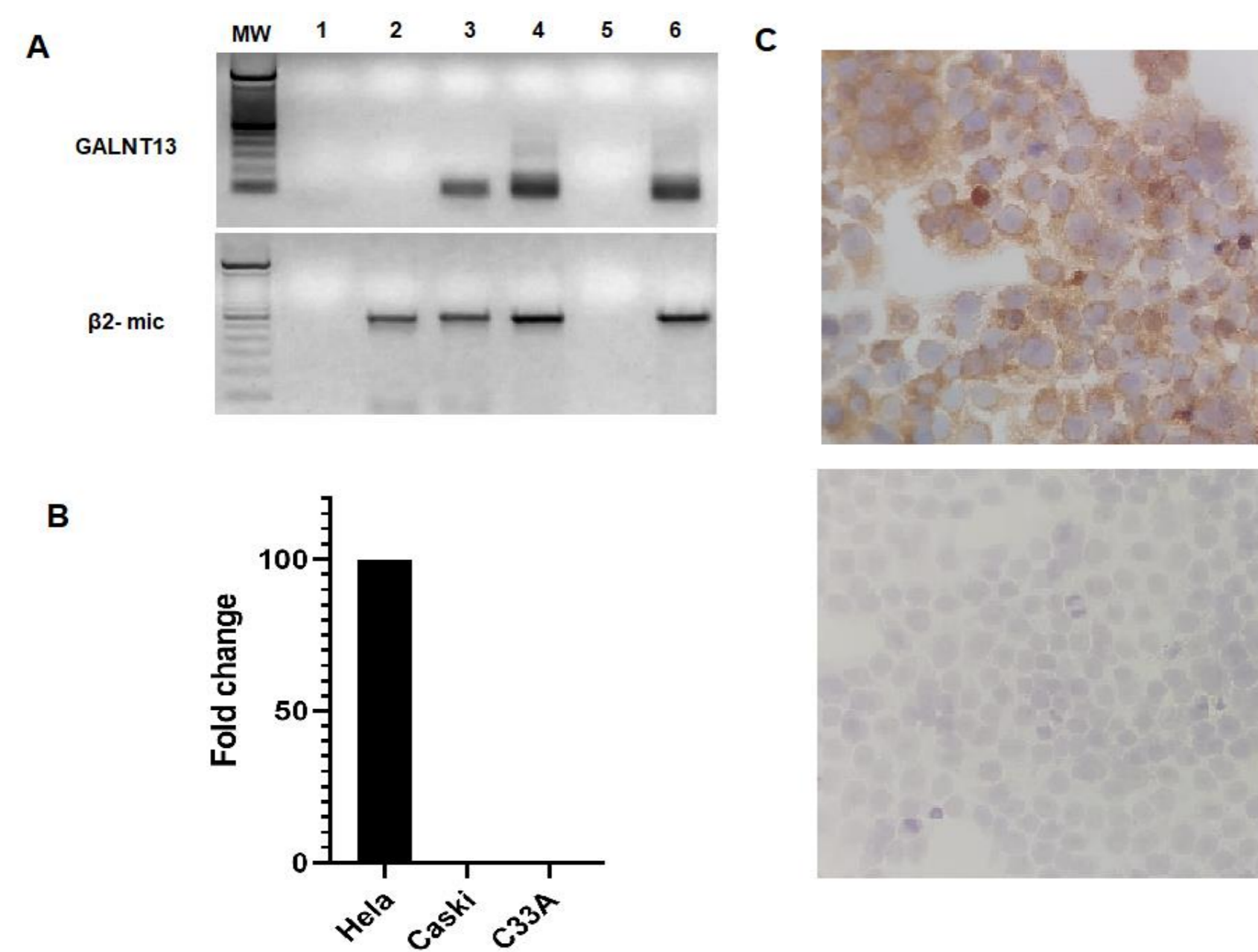
**Figura 2: La Expresión de GaINAc-T13 es significativamente mayor en ganglios linfáticos metastásicos en comparación con los tumores primarios respectivos.**

(A) Comparación de la expresión media de GaINAc-T13 por tumores primarios y ganglios linfáticos metastásicos ( $p = 0,034$ ). (B) Inmunotinción de GaINAc-T13 en tumor primario y correspondiente metástasis en ganglio linfático. Ampliación de imágenes 400X.



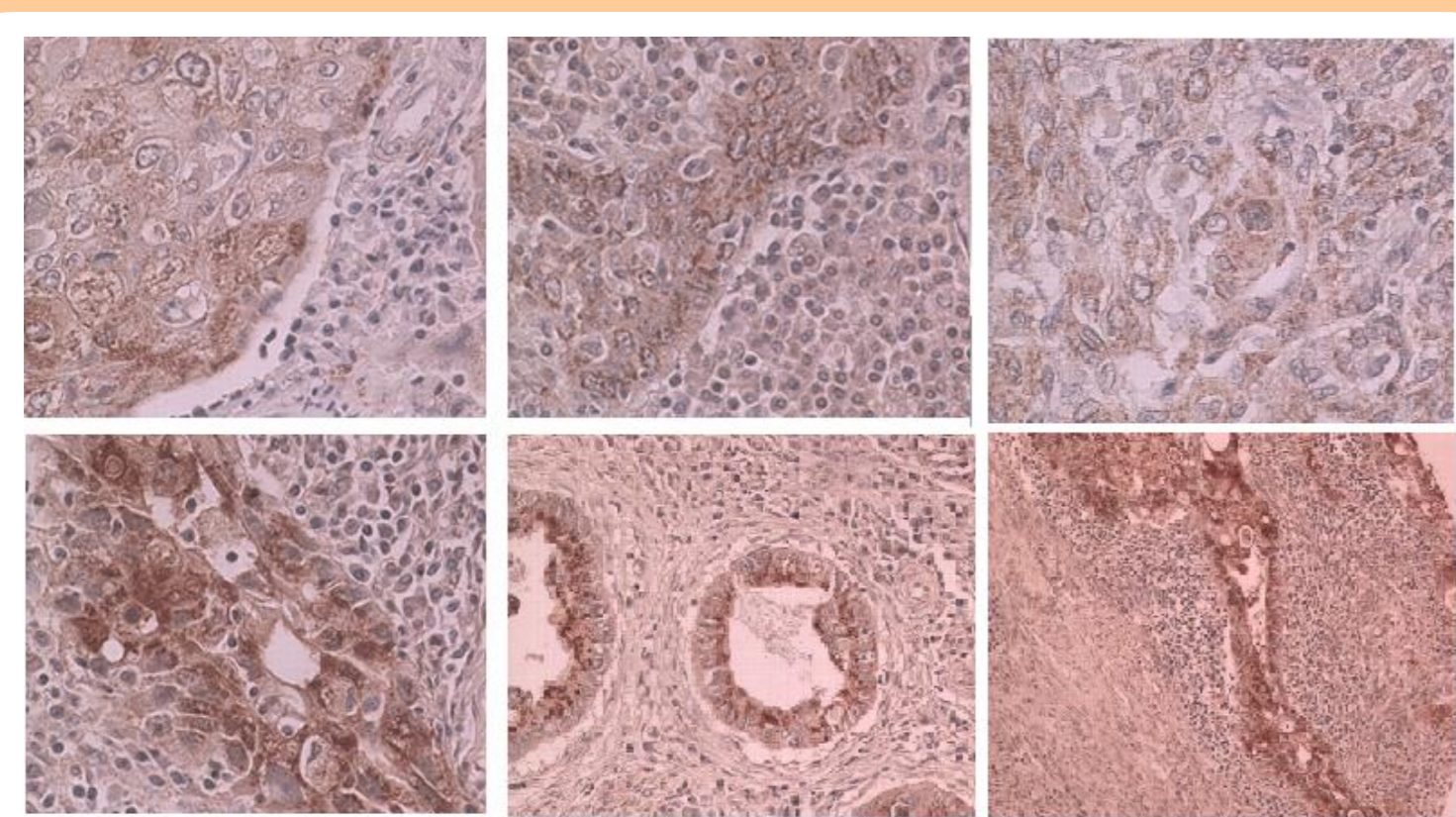
**Figura 3: GaINAc-T13 se correlaciona con menor supervivencia global en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad y en pacientes con ganglios linfáticos metastásicos.**

(A) Tumores en estadio avanzado (IIB y III) ( $n = 75$ ). (B) Pacientes con ganglios linfáticos metastásicos ( $n = 87$ )



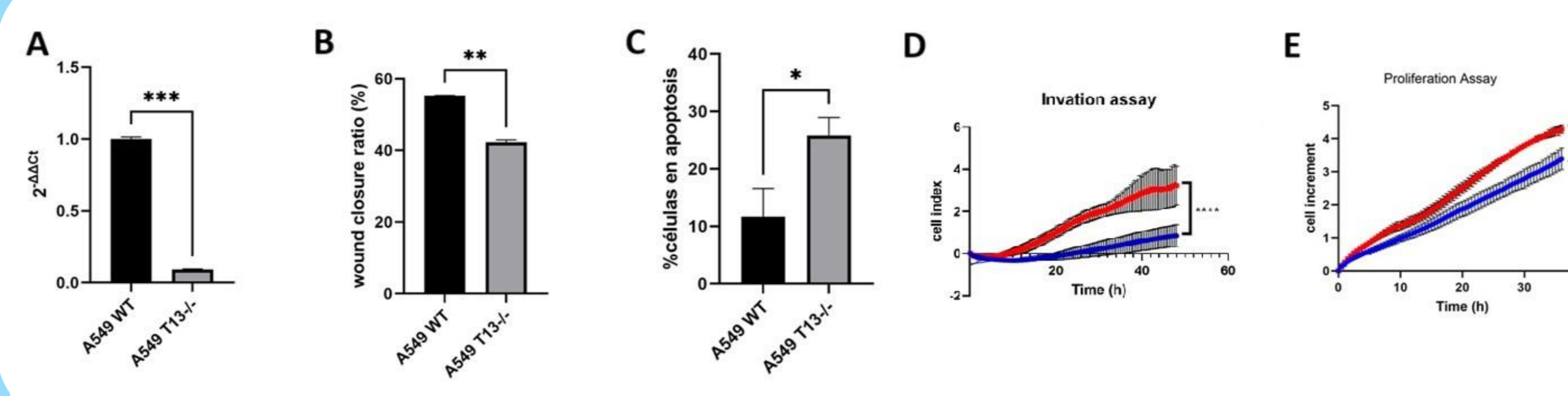
**Figura 4. GaINAc-T13 se expresa en líneas de cáncer de cuello uterino humano**

(A) Nested-RT-PCR amplificando ARNm de GALNT13 y RT-PCR amplificando  $\beta$ 2- microglobulina como control de calidad del ADNc.; MW, DNA ladder 100 pb (Thermo Fischer); 1, control negativo de master-mix; 2, Caski; 3, C33A; 4, Hela; 5, agua ultrapura libre de ARNasas como control negativo; 6, BM como control positivo. (B) real-time PCR para las mismas líneas celulares de cáncer cervical. (C) Inmunohistoquímica evaluando expresión de GaINAc-T13 a nivel de proteína en Hela (imagen superior) control negativo (imagen inferior). Aumento 40X.



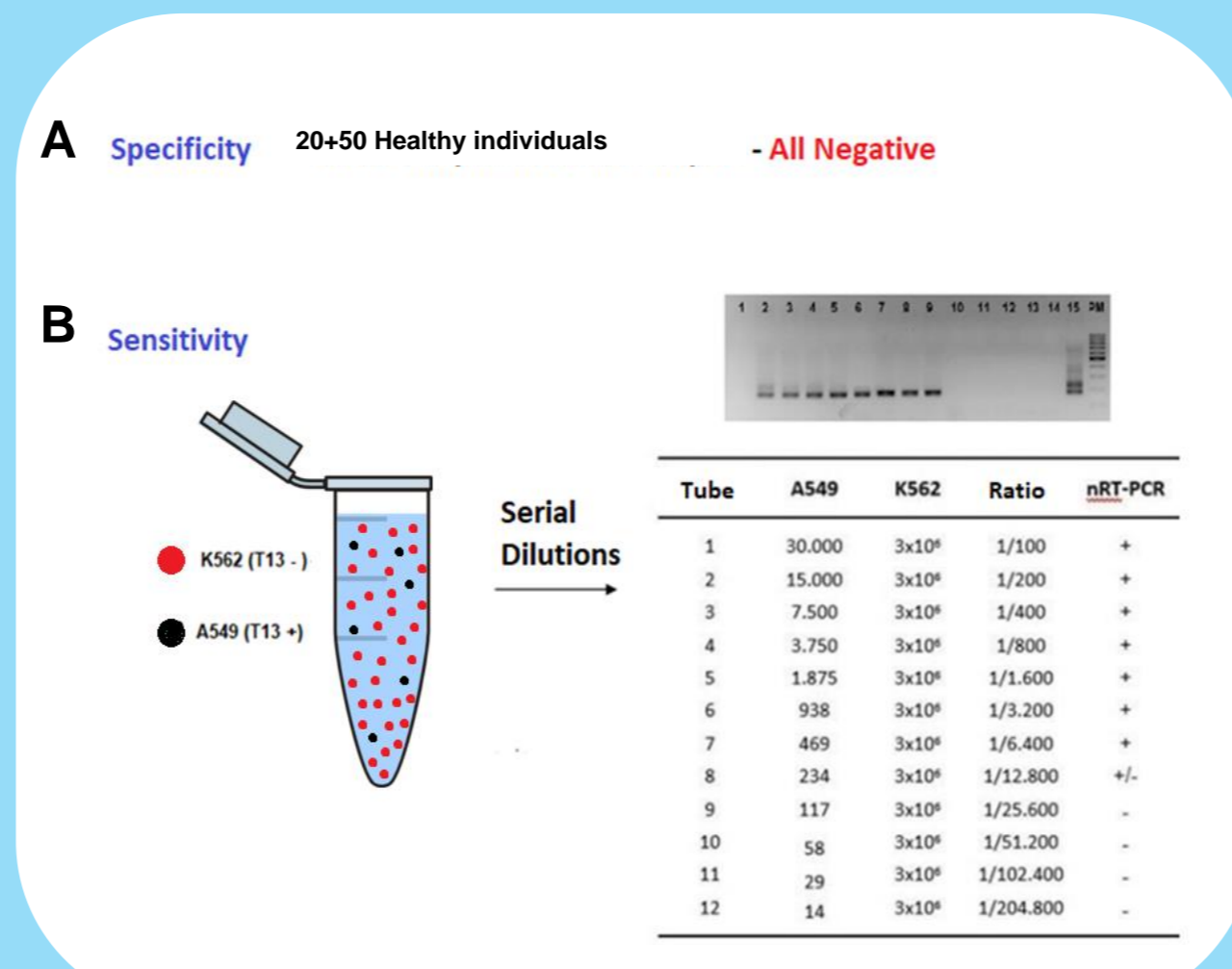
**Figura 5: GaINAc-T13 se expresa diferencialmente en tumores cervicales respecto a tejido normal adyacente.**

Se observa tinción positiva en tejido tumoral de cuello uterino. Tejido no tumoral adyacente negativo.



**Figura 6: El silenciamiento de GALNT13 afecta diversas propiedades del fenotipo tumoral.**

(A) Expresión de GALNT13 en A549 WT y A549 T13<sup>-/-</sup>. (B-E) Ensayos in vitro en A549 WT y A549 T13<sup>-/-</sup>. (B) Ensayo de herida en placa (migración). (C) Ensayo de apoptosis. (D) Ensayo de invasión. (E) Ensayo de proliferación celular.



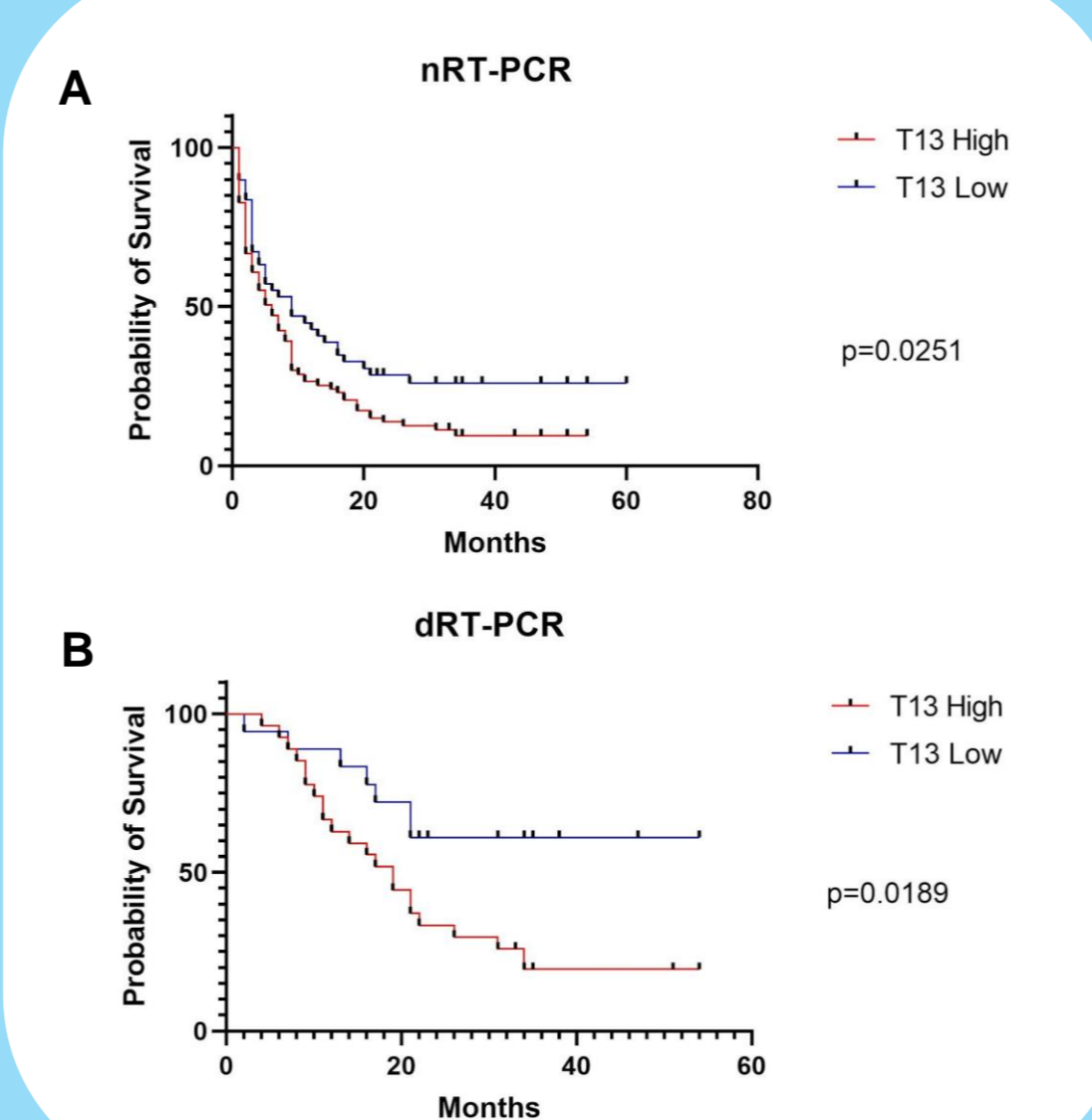
**Figura 7: Se optimizaron un método RT-NESTED-PCR y uno de RT-digital PCR para detectar y cuantificar respectivamente la expresión de GALNT13.**

Evaluación de la especificidad (A) y la sensibilidad (B)

	GALNT13 (+)		GALNT13 (-)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Patients</b>	n=137	88 (64.2)	49 (35.8)	
<b>Age</b>	Median 65			
	Range 32-84			
<b>Sex</b>	F (n=45, 32.8%)			
	M (n=92, 67.2%)			
<b>Histology</b>	ADC (n=76)	49 (64.5)	27 (35.5)	
	SCC (n=32)	21 (65.6)	11 (34.4)	
	Others (n=29)	18 (62.1)	11 (37.9)	
<b>Stage</b>	I-IIIa (n=31)	17 (54.8)	14 (45.2)	
	IIIb-IV (n=106)	70 (66)	36 (34)	

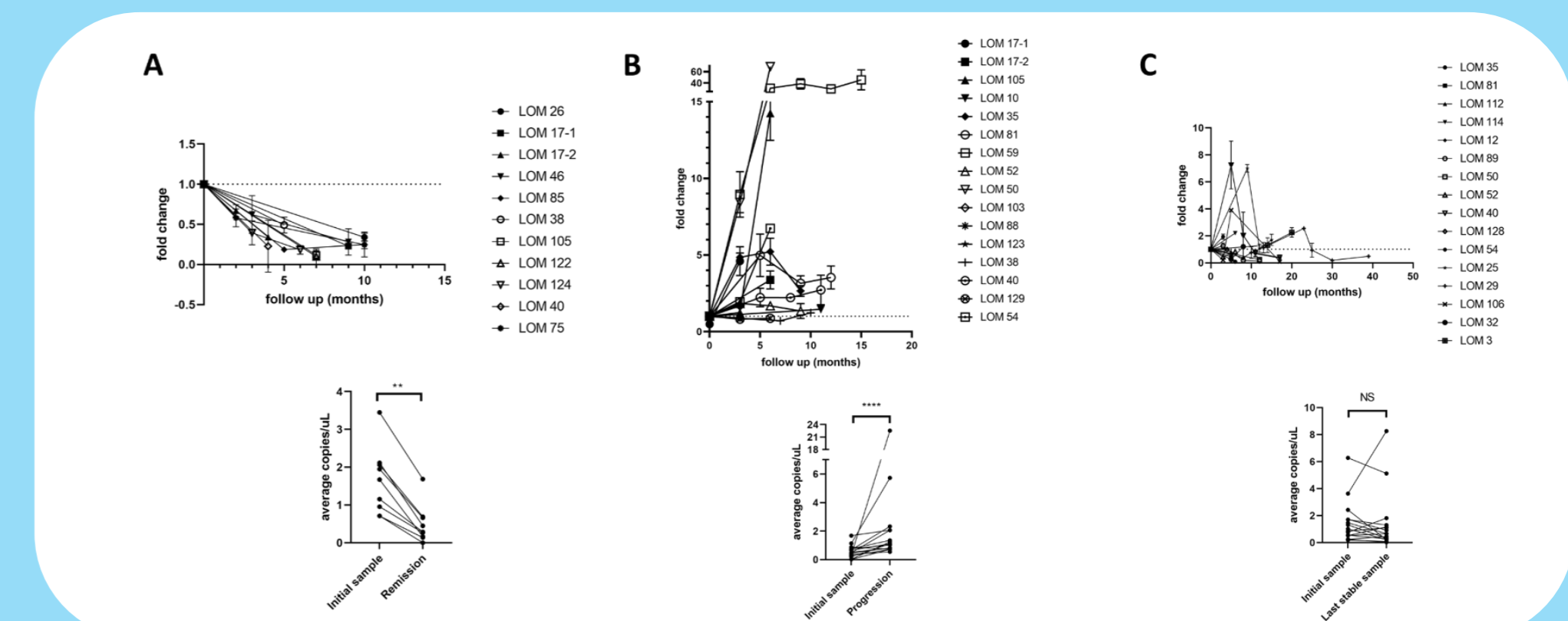
**Figura 8: Se analizó la expresión de GALNT13 en pacientes con NSCLC.**

(A) Análisis por RT- NESTED-PCR. (B) Análisis por RT-Digital-PCR. NSCLC – cáncer de pulmón a células no pequeñas, nRT-PCR - NESTED-RT-PCR, dRT-PCR - Digital-RT-PCR, ADC - adenocarcinoma, SCC, carcinoma escamoso.



**Figura 9: La expresión de GALNT13 en sangre de pacientes con NSCLC se correlacionó con peor pronóstico.**

(A) Análisis por nRT-PCR ( $n=137$ ). (B) Análisis por dRT-PCR ( $n=45$ ). Log-rank (Mantel-Cox) test, se consideró  $p$  significativo cuando fue menor a 0.05.



**Figura 10: La expresión de GALNT13 se correlacionó con el seguimiento de la enfermedad.**

Se clasificó a los pacientes en remisión, progresión o estable según resultados imagenológicos. (A) Pacientes en remisión. (B) Progresión o (C) Enfermedad estable. Mann Whitney test. NS  $P > 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Logramos demostrar la expresión de GaINAc-T13 tanto a nivel de ARNm como proteína en cáncer de mama, cuello uterino y pulmón. En cáncer de mama, encontramos que GaINAc-T13 tuvo mayor expresión en los ganglios linfáticos metastásicos en comparación con los tumores de mama primarios respectivos. En cáncer de pulmón, se correlacionó con propiedades que caracterizan al fenotipo tumoral. A su vez, logramos optimizar dos procedimientos de biopsia líquida para analizar la expresión de esta enzima en sangre periférica de pacientes con NSCLC. GALNT13 se correlacionó significativamente con el seguimiento de la enfermedad. Tanto en cáncer de mama y pulmón, este marcador se correlacionó con peor evolución clínica. Lo anterior sugiere que esta enzima podría ser un nuevo biomarcador de subtipos de cáncer de mama y pulmón más agresivos y un candidato potencial para tratamientos dirigidos. Queda por continuar con la dilucidación de los mecanismos moleculares responsables de esta asociación.