

Patrón de Expresión Molecular en Líneas Celulares de Cáncer de Mama; Exploración de Potenciales Blancos de Nanopartículas Magnéticas

L.F.E. Huerta^{1,2}, V. Sánchez², G. Iglesias¹, J.G. Silva², C. I. Guerrero¹, N. M. Pérez¹, R. Chacón¹, V. Jimenez¹ y C.A. González^{1*}

¹ Instituto Politécnico Nacional-Escuela Superior de Medicina, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.

² Escuela Militar de Graduados de Sanidad-Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México.

*Autor de correspondencia: cgonzalezd@ipn.mx

Resumen— El Cáncer de Mama (CaMa) es la neoplasia más frecuente en la mujer a nivel mundial, y la metástasis la primera causa de fallecimiento en los pacientes con cáncer. La detección oportuna de Células Tumorales Circulantes (CTC) representa una posibilidad de prevenir procesos metastásicos y recidivas durante el tratamiento del CaMa. Nuestro grupo de investigación propone una nueva tecnología para la detección de CTC por medio de mediciones de espectroscopía de bioimpedancia asistida con nanopartículas magnéticas acopladas con anticuerpos que reconocen proteínas de superficie (nanosondas). Como un primer paso, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión relativa de tres genes: Her-2, EpCAM y Muc-1, en tres líneas celulares de CaMa, los cuales codifican para proteínas de superficie que podrían representar blancos de nanosondas. Los resultados indican que los genes estudiados presentan una expresión relativa diferenciada, mayor para EpCAM y Muc-1, por lo que en nuestro estudio las proteínas para las que codifican tales genes representan los mejores candidatos a blancos de nanosondas. Un primer experimento de incubación de nanosonda “anti-EpCAM - Nanopartícula Magnética” con células cancerígenas de la línea MCF-7, mostró la viabilidad de emplear tal marcador molecular como blanco de nanosondas con propiedades magnéticas.

Palabras clave— expresión relativa, líneas celulares, nanosonda.

I. INTRODUCCIÓN

El Cáncer de Mama (CaMa) es uno de los mayores problemas de salud pública en todo el mundo. En México, a partir del 2006, el Cáncer de Mama ha sido la primera causa de muerte por cáncer y la segunda por muerte general en mujeres entre 30-50 años, es causa de altos niveles de mortalidad debido a una falta de detección oportuna, falta de respuesta al tratamiento y metástasis, siendo esta última una condición incurable ya que en promedio la supervivencia después de 5 años es menor al 25%. A través de varias investigaciones en las cuales se ha estudiado el proceso de metástasis se ha determinado la presencia de células tumorales circulantes (CTC) en torrente sanguíneo, como parte de una serie de acontecimientos que culminan en la propagación de células cancerígenas del sitio de origen a uno distinto, evidenciando la detección de CTC como un importante indicador de metástasis. [1,2,3].

La detección de CTC permite monitorizar el seguimiento de la enfermedad, se puede elegir una opción terapéutica y demostrar si cierto tratamiento está siendo

efectivo al cuantificar las CTC, evitando que los pacientes se expongan a tratamientos ineficaces y con efectos tóxicos. El número de CTC encontradas en los carcinomas, están directamente relacionadas con el pronóstico y la supervivencia [4,5]. Debido a la relevancia de la detección de CTC en una muestra sanguínea de pacientes con cáncer, algunos investigadores han nombrado este procedimiento “biopsia líquida en tiempo real”. [6]

Actualmente existen diferentes tecnologías para la detección de CTC basadas en sus propiedades físicas y biológicas, sin embargo la cantidad de CTC en sangre periférica es de 1-10 CTC por 10^9 del total de células sanguíneas [7], por lo que continuamente se están buscando mejoras en dichas tecnologías que demandan equipamiento costoso y procesos especializados, debido a lo cual se requieren de propuestas tecnológicas emergentes que puedan representar alternativas de detección de CTC susceptibles de emplearse en escalones de atención de la salud de bajos recursos.

En un estudio reportado por Hengyi Xu y colaboradores en el 2011 se muestra la viabilidad de una técnica para realizar la separación de CTC de sangre total por técnicas inmunomagnéticas [8]. En el 2007, Arum Han y sus colaboradores mostró en un estudio la viabilidad de diferenciar células tumorales de normales a través de la caracterización de sus propiedades eléctricas medidas con Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE). [9]

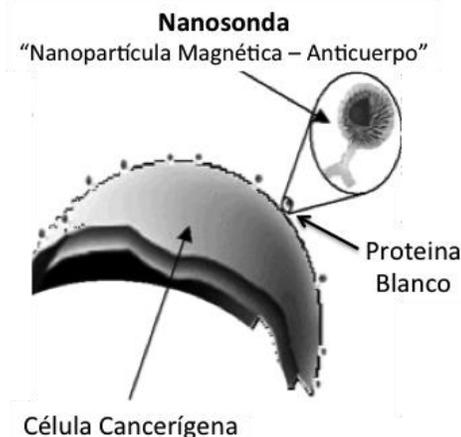


Fig. 1. Representación del concepto de marcado de células cancerígenas con nanopartículas magnéticas acopladas con anticuerpos (nanosondas).

Nuestro grupo de investigación ha propuesto la detección de CTC a través de mediciones de espectroscopía de bioimpedancia asistida con nanopartículas magnéticas acopladas con anticuerpos que reconocen proteínas de superficie (Figura 1). La idea central es adherir nanosondas magnéticas en la superficie de CTC, separarlas y anclarlas por métodos inmunomagnéticos en la superficie de un biosensor basado en mediciones de bioimpedancia. Como un primer paso es la identificación de potenciales antígenos blanco de nanosondas, en éste trabajo se evalúa el patrón de expresión relativa de tres genes: Her-2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano), EpCAM (molécula de adhesión epitelial) y Muc-1 (mucina 1) en tres líneas celulares de cáncer de mama. Adicionalmente se realiza un primer experimento de incubación de nanosonda “anti-EpCAM - Nanopartícula Magnética” con células cancerígenas de la línea MCF-7.

II. METODOLOGÍA

1) Líneas celulares tumorales.

Se emplearon tres líneas celulares de Cáncer de Mama: MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3, con cada una se realizaron tres cultivos independientes, obteniendo tres réplicas biológicas por línea con el fin de evaluar la expresión relativa de Her-2, EpCAM y Muc-1 por medio de transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR).

2) Análisis de expresión diferencial por RT-qPCR.

Para evaluar la expresión génica, se aisló RNA correspondiente a cada réplica biológica, el cual se cuantificó por medio de un espectrofotómetro a longitudes de onda de 260 nm, a continuación las muestras fueron tratadas con DNasa (RQ1 RNase-free DNase Promega) para evitar cualquier contaminación con DNA genómico. Posteriormente se realizó la síntesis de DNA complementario correspondiente a cada réplica biológica con el kit Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen), sometiendo las muestras a las condiciones de PCR indicadas en dicho protocolo.

Para el diseño de los oligonucleótidos de los genes de importancia en nuestra investigación incluyendo el gen endógeno, se utilizó el software Primer Express versión 3.0 de Applied Biosystems como se muestra en la Tabla 1.

La amplificación de genes por PCR en tiempo real se empleó el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS versión 1.1, utilizando SYBER Green como sistema de detección y el Kit SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), para el monitoreo de la amplificación del producto durante cada ciclo de reacción.

Con el fin de verificar la especificidad de nuestros amplicones finalizada la PCR, se construyeron curvas de disociación de cada gen amplificado sometiendo cada muestra a un rango de temperatura de 60°C a 95°C, ya que al aumentar la temperatura, la señal de fluorescencia observada muestra un punto de inflexión donde el 50 % del producto se ha desnaturalizado al graficar la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura, se obtiene un pico que indica la temperatura de desnaturalización (Tm) específica del producto [10].

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en RT-qPCR.

gen	secuencia 5'-3'
Her-2	S: ACCTTTCTACGGACGTGGGA A: ACCTCTCGCAAGTGCTCCAT
EpCAM	S: GCTGGCCGTAAGTCTTTG A: TTTTGCTCTCTCCAAGTTTTG
Mucina 1	S: AAGAACTACGGGCAGCTGGA A: TGCCACCATTACCTGCAGAA
Actina	S: CGGGAGATTGTGCGAGATGT A: GGAAGCGTTCATCCCAATG

Con el objetivo de validar nuestra reacción de RT-qPCR, se graficó el ciclo umbral (CT) con respecto a su dilución en nanogramos de cDNA correspondiente, obteniendo una curva cuya pendiente permite calcular la eficiencia de amplificación (E) de los genes de interés y endógeno mediante la ecuación de Ramussen [11].

$$E = 10^{(\text{pendiente})} - 1$$

El procedimiento de cuantificación fue por medio del método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) empleando la fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [12], para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.01.

3) Acoplamiento inmuno-magnético

Como un experimento inicial y con la finalidad de verificar la viabilidad de utilizar un blanco molecular de superficie celular, se realizó un bioconjugado generando una nanosonda mediante la unión del anticuerpo monoclonal EpCAM (CD326, Biolegend) con nanopartículas de ferrita-cobalto de 100nm, recubiertas de sílice, las cuales son biocompatibles y con propiedades magnéticas (nanoscreen MAG/G-ARA Chemicell). El proceso de bioconjugación se llevó a cabo mediante el método de carbodiimida, la cual reacciona con los grupos amino-terminal de las nanopartículas provocando que se vuelvan altamente reactivos a los productos intermedios de O-asilourea y a su vez reaccionen con los grupos carboxilo presentes en la región constante de las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales, lo que permite una unión covalente y por lo tanto la formación de una nanosonda. (protocolo A-10,

Chemicell). Posteriormente se realizó incubación de la línea celular MCF-7 con la nanosonda para el marcaje de las mismas y se observó mediante el empleo del microscopio de fluorescencia Eclipse Ti-U (Nikon) a un aumento de 40x.

III. RESULTADOS

La especificidad de la reacción de RT-qPCR para los genes de estudio se determinó por medio de las curvas de disociación, donde se observa una Tm específica correspondiente a cada gen, así como su blanco de reactivos con ausencia de amplificación. Figura 2.

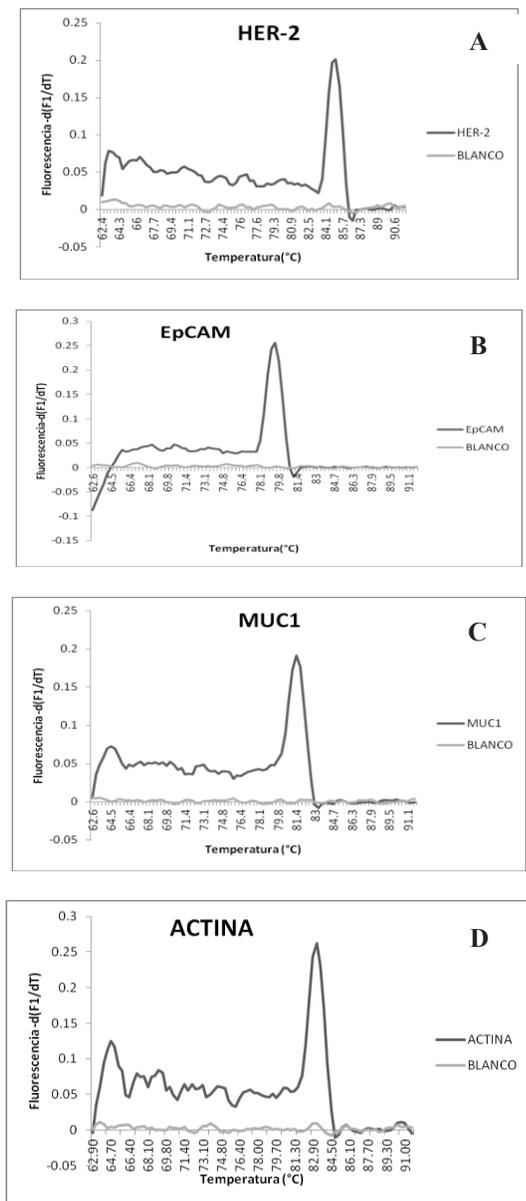


Fig. 2. Curvas de disociación de los genes estudiados, las cuales se obtuvieron al graficar la derivada negativa de la fluorescencia y la temperatura. A) Her-2, B)EpCAM, C)Muc-1 y D) Actina.

Con el fin de corroborar los productos de PCR de los genes de estudio posterior a la estandarización de los procedimientos de detección por medio de curvas de disociación, se realizó un gel de agarosa al 3% con tinción de bromuro de etidio donde se muestra los tamaños esperados (151pb) de los productos de amplificación de cada gen con respecto a su blanco. Figura 3.



Fig. 3. Productos de PCR de tamaños específicos con su correspondiente blanco.

En la figura 4 se muestra la gráfica de la expresión relativa de los tres genes estudiados para cada línea celular. MCF-7 fue la línea que presentó mayor expresión en todos los marcadores, destacando entre ellos EpCAM seguido de Muc-1. MDA-MB-231 y SK-BR-3 presentaron niveles de expresión bajos respecto a MCF-7, destacando Muc-1 para MDA-MB-231 y Her-2 en SK-BR-3.

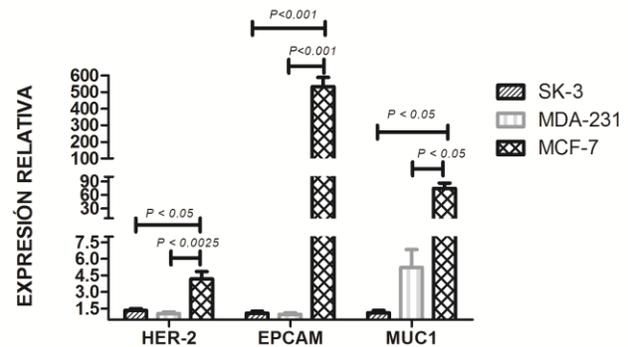


Fig. 4. Se muestra la expresión relativa de los tres genes estudiados en cada una de las líneas celulares.

Por medio de microscopía de fluorescencia fue posible observar la presencia de nanosonda dirigida a la proteína de superficie EpCAM en la línea celular MCF-7 indicando la especificidad de la nanosonda y su funcionalidad al reconocer dicha proteína. Figura 5.

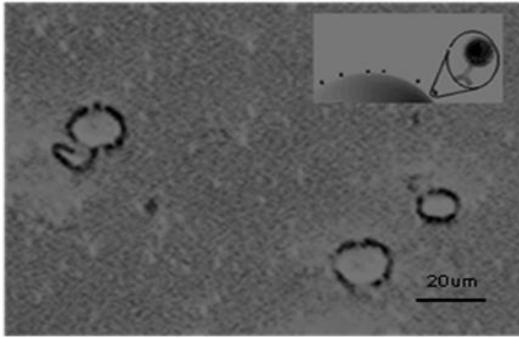


Fig. 5. Inmunofluorescencia posterior al acoplamiento con nanosonda “anti-EpCAM - Nanopartícula Magnética” con células cancerígenas de la línea MCF-7.

IV. DISCUSIÓN

Se muestra la expresión relativa de Her-2, EpCAM y Muc-1 las cuales codifican proteínas de superficie que actualmente forman parte de una serie de estrategias para detectar células tumorales circulantes [1,2,4], mostrando una sobreexpresión de EpCAM como lo reportan Walid A. y colaboradores [13]. En la línea celular de MCF-7, se puede observar la diferencia en la expresión de los tres genes, sin embargo predominó la expresión de EpCAM y Muc-1, esto probablemente por las características de dicha línea ya que se emplea como un modelo de estadio temprano de CaMa resultando en una sobreexpresión de genes relacionados con el origen epitelial, a diferencia de un proceso de transición epitelial-mesenquimal [14]. Razón por la cual se podría explicar una menor expresión de marcadores de origen epitelial representados por EpCAM y Muc-1 en MDA-MB-231 y en SK-BR-3, predominantemente en esta última ya que se utiliza como un modelo de estadio avanzado.

V. CONCLUSIÓN

Los resultados indican que los genes estudiados presentan una expresión relativa diferenciada mayor para EpCAM y Muc-1, por lo que las proteínas para las que codifican tales genes representan los mejores candidatos a blancos de nanosondas. Un primer experimento de incubación de nanosonda “anti-EpCAM - Nanopartícula Magnética” con células cancerígenas de la línea MCF-7, mostró la viabilidad de emplear tal marcador molecular como blanco de nanosondas con propiedades magnéticas.

RECONOCIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias al apoyo de CONACYT CB2012 a través del grant No 180536 y al Programa de Fortalecimiento Académico de Posgrado de alta Calidad de la ESM-IPN.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Samia A. Ebeed, Nadia A. Abd El-Moneim, Ahmed Saad, Ebtsam RE. Zaher, Omayma G. Yassin, Shadwa A. Khamis” Diagnostic and prognostic value of circulating tumor cells in female breast cancer patients” Alexandria Journal of Medicine; vol. 48, pp. 197–206, Febrero 2012.
- [2] Esmeralda Morán Mendoza, Jorge Rodríguez Gallegos, Manuel Lara Lozano, Celia Piña Leyva, María del Rocío Thompson Bonilla, Guillermina Rosas Sandoval, Hayde Nallely Moreno Sandoval *et. al.*” Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico.” Rev Esp Méd Quir; vol. 19, pp. 45-51, 2014.
- [3] Mario Giuliano Antonio Giordano, Summer Jackson, Ugo De Giorgi, Michal Mego, Evan N Cohen, Hui Gao, *et. al.*” Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination” Breast Cancer Research; vol.16, pp.440, 2014.
- [4] Athina Markou, Areti Strati, Nikos Malamos, Vasilis Georgoulas and Evi S. Lianidou. “Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer by a Liquid Bead Array Hybridization Assay.” Clinical Chemistry; vol. 57, pp. 3421–430, 2011.
- [5] Luz Fernanda Sua Villegas, Nhora María Silva Pérez, Marta Vidaurreta Lázaro, María Luisa Maestro de las Casas, Sara Rafael Fernández y Silvia Vezanones de Castro” Actualidad y futuro en las técnicas de cuantificación de células tumorales circulantes: su importancia en tumores sólidos epiteliales.” Rev Lab Clin; vol. 4, pp. 163-169, 2011.
- [6] Catherine Alix-Panabier and Klaus Pantel “Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer” Clinical Chemistry; vol. 59, pp. 110–118, 2013.
- [7] Daniel L. Adams, Steingrímur Stefánsson, Christian Haudenschild, Stuart S. Martin, Monica Charpentier, Saranya Chumsri, Massimo Cristofanilli, Cha-Mei Tang, R. Katherine Alpaugh. “Cytometric Characterization of Circulating Tumor Cells Captured by Microfiltration and Their Correlation to the CellSearchVR CTC Test.” Cytometry Part A (2015); vol. 87A, pp. 137-144, 2015.
- [8] X Hengyi Xu, Zoraida P. Aguilar, Lily Yang, Min Kuang, Hongwei Duan, Yonghua Xiong, Hua Wei and Andrew Wang. “Antibody Conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Cell Separation in Fresh Whole Blood”. Biomaterials; vol. 32(36), pp. 9758–9765, 2011.
- [9] Arum Han, Lily Yang and A. Bruno Frazier.” Quantification of the Heterogeneity in Breast Cancer Cell Lines Using Whole-Cell Impedance Spectroscopy Clin Cancer Res; vol. 13(1), pp.139-43, January 2007.
- [10] Jochen Wilhelm, Alfred Pingoud and Meinhard Hahn. “Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes” Nucleic Acids Research; vol. 31, No. 10 e56 2003.
- [11] Rasmussen, R (2001) Quantification on the LigthCycler. In Meuer, S., Witter, C. and Nakagawara, K. (eds), Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg. 21-34
- [12] Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method.” METHODS; vol.25, pp. 402–408, 2001.
- [13] Walid A. Osta, Yian Chen, Kaidi Mikhitarian, Michael Mitas, Mohamed Salem, Yusuf A. Hannun, David J. Cole, and William E. Gillanders. “EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy.” CANCER RESEARCH; vol. 64, pp. 5818–5824, Agosto, 2004.
- [14] Tobias M Gorges, Ingeborg Tinhofer, Michael Drosch, Lars Röse, Thomas M Zollner, Thomas Krahn and Oliver von Ahsen.” Circulating tumour cells escape from EpCAMbased detection due to epithelial-to-mesenchymal transition.” BMC Cancer; 12:178, 2012.