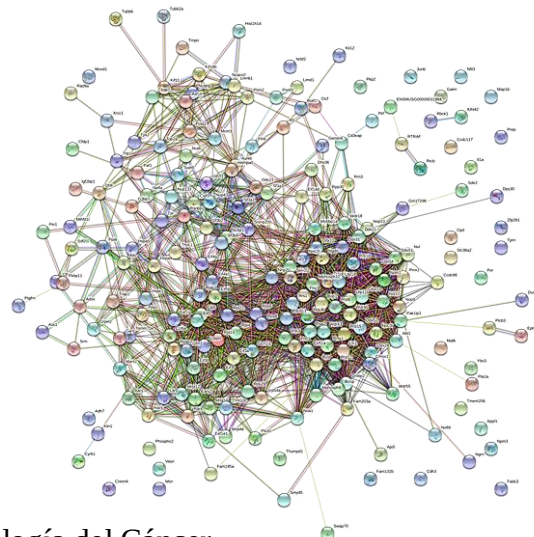
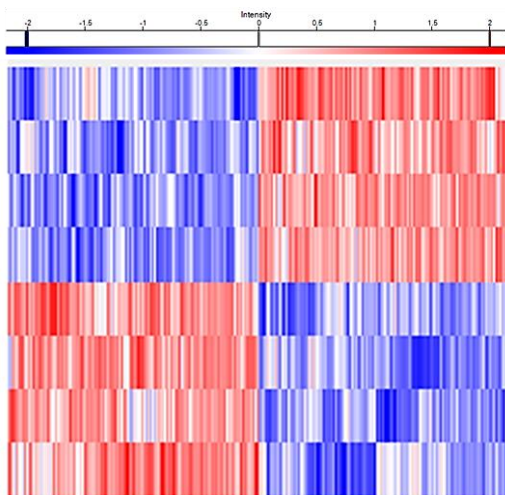
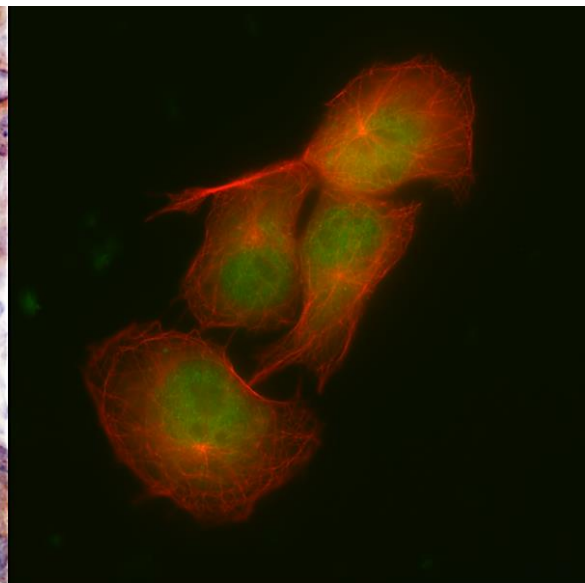
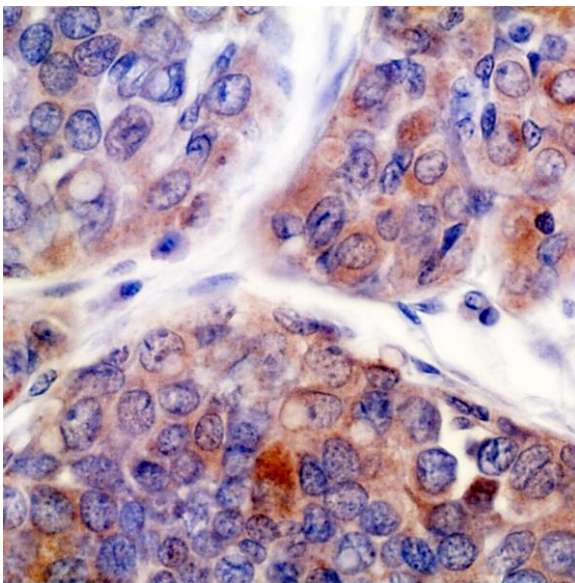


TESIS DE GRADO

De la Licenciatura en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DEL PROTEOMA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA MAMARIO LUEGO DE LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE HEMOXIGENASA-1 CON HEMINA



Investigación en Biología del Cáncer

Laboratorio de la Biología del Cáncer

INIBIBB-UNS-CONICET

Karen Schweitzer



Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional Del Sur

UNS

ESTUDIO DEL PROTEOMA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA MAMARIO LUEGO DE LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE HEMOXIGENASA-1 CON HEMINA

Tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

Karen Schweitzer

Laboratorio de la Biología del Cáncer
INIBIBB-UNS-CONICET
22 de Mayo del 2020

RESUMEN

La Hemoxigenasa-1 (HO-1) es una enzima microsomal que cataliza la degradación del grupo hemo y a su vez se puede translocar a múltiples compartimentos subcelulares. Nuestro laboratorio, entre otros, demostró que HO-1 regula múltiples procesos relacionados a la progresión tumoral tales como: proliferación/apoptosis, migración, invasión, metástasis y la transición epitelio-mesénquima. Se ha demostrado que la actividad y expresión de esta enzima es modulada por el tratamiento con hemina. El objetivo de este trabajo fue estudiar las modificaciones que ocurren en el proteoma de una línea celular de carcinoma mamario, luego del tratamiento de la misma con el potente inductor de HO-1 conocido como hemina, utilizando para ellos la técnica de espectroscopia de masas (EM). Los datos obtenidos a partir de esta técnica y su posterior análisis bioinformático mostraron que, de las 7292 proteínas detectadas, 1033 fueron moduladas luego del tratamiento con hemina. Observamos que 595 proteínas estaban incrementadas, incluyendo a HO-1, y 353 habían disminuido en el grupo tratado con hemina respecto a los controles. El análisis de datos de EM mostró que el tratamiento con hemina regula proteínas del citoesqueleto, incluyendo a factores activadores de la familia de Rho GTPasas y proteínas involucradas en las vías de señalización del cáncer. Además, las enzimas del metabolismo lipídico, proteínas relacionadas al metabolismo del hierro y de la biogénesis ribosomal fueron también moduladas luego del tratamiento. Muchos de los análisis *in-silico* fueron corroborados mediante ensayos bioquímicos. Estos resultados muestran los efectos fisiológicos múltiples que la modulación farmacológica de HO-1 posee en una línea celular de carcinoma mamario.

ABSTRACT

Hemeoxygenase-1 (HO-1) is a microsomal enzyme that catalyzes the degradation of the heme group and it can be translocated to multiple subcellular compartments. Our laboratory, among others, has shown that HO-1 regulates several processes related to cancer progression such as: proliferation/apoptosis, migration, invasion, metastasis and the epithelial-mesenchymal transition. It has been reported that Hemin treatment increased HO-1 activity and expression. The aim of this work was to study the protein expression modification due to hemin treatment, a potent HO-1 expression driver, in a breast cancer cell line. This proteome analysis was performed using Mass Spectrometry (MS) technique. MS-data analysis showed that 1033 from 7292 proteins detected were modulated after hemin treatment. We observed that 595 proteins were increased, including HO-1 and 353 proteins were decreased in the group treated with hemin respect to their controls. Interestingly the MS-data analysis showed that hemin treatment regulates cytoskeletal proteins, including Rho-family GTPases activators and signal transduction cancer related proteins. In addition, lipid metabolism enzymes, heme- and iron- related protein expression and ribosome biogenesis related proteins were also modulated. We further corroborated by biochemical studies some of the *in-silico* analysis. These results show the multiple physiological effects that pharmacological modulation of HO-1 has in a breast cancer cell line.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional del Sur que me dio la oportunidad de desarrollar mi carrera de grado.

Al INIBIBB por darme el lugar y herramientas físicas que han permitido el desarrollo de los experimentos realizados en esta tesis.

Al Max Planck de Alemania por permitir realizar la espectrometría de masas en sus instalaciones.

A Alejandro y María Marta quienes me permitieron desarrollar la tesina en el Laboratorio de la Biología del Cáncer.

A Ariel y Georgina, mis directores, por haberme acompañado y enseñado muchísimo durante este año y por permitirme dar mis primeros pasos en el ámbito científico.

A todos los integrantes del laboratorio por hacerme sentir tan cómoda y siempre estar dispuestos a darme una mano, y a Martín por ayudarme con el análisis de los lípidos.

A Natalia, mi profesora consejera, por acompañarme en cada decisión durante mi último año de carrera.

A los profesores de esta hermosa carrera quienes me transmitieron el entusiasmo y amor que tengo por la biología.

A mis compañeros de cursada quienes hicieron más ameno el camino recorrido.

A mis amigas de toda la vida que siempre confiaron en mí y me apoyaron en este trayecto.

A mi novio Lucas quien me brindó su apoyo incondicional en cada examen, en cada etapa de la carrera.

A mis abuelos, tías y familiares quienes siempre me brindaron sus palabras de aliento.

A mi hermano Kevin quién me acompañó durante este camino en Bahía Blanca.

Y por sobre todo a mis padres que con mucho esfuerzo hicieron posible que estudie la carrera que amo.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
Rol enzimático de Hemoxigenasa	7
HO-1 en cáncer	8
Señalización desde la matriz extracelular	11
El Citoesqueleto celular, su rol en la migración celular y en el cáncer.....	14
Rol de la HO-1 en el metabolismo del hierro	14
Rol de la HO-1 en el metabolismo de los lípidos	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Estudios en biopsias humanas	17
Inmunohistoquímica.....	17
Correlacion con datos clinicos histopatológicos	18
Estudios con cultivos celulares.....	19
Preparación de la solucion stock de hemina	19
Espectrometría de masas	19
Inmunofluorescencia	21
Ensayo de migración	22
Extracción de lípidos y cromatografía en capa fina	22
Estudios en Modelos animales	23
Modelo de implante subcutáneo de células LM3 en ratones singeneicos BALB/C.....	23
Estadística	23
RESULTADOS	24
Cambios en la expresión de proteínas observados por análisis proteomico luego de la modulación farmacológica con hemina en la línea celular LM3	24
HO-1 se encuentra sobreexpresada en la línea celular LM3 y en biopsias humanas de cáncer de mama	25

El tratamiento con hemina en la línea celular de carcinoma mamario LM3 alteró los niveles de varias proteínas vinculadas al cáncer	27
Aumento de la expresión de proteasas involucradas en la escisión del extremo C-terminal de HO-1 luego de la modulación farmacológica con hemina en la línea celular LM3	27
La modulación farmacológica en LM3 con hemina produce cambios en los niveles de expresión en proteínas vinculadas a las adhesiones focales y del citoesqueleto	28
Disminución de la expresión de GEF-H1 luego de la modulación farmacológica con hemina de la línea celular LM3	31
Aumento de la expresión del activador de RhoA-GTPasas, GEF-H1, en biopsias humanas de carcinoma mamario	31
La modulación farmacológica con hemina en la línea celular LM3 produce cambios en la expresión de proteínas vinculadas con el metabolismo del hierro	33
La modulación farmacológica con hemina en la línea celular LM3 produce cambios en los niveles de expresión de proteínas vinculadas al metabolismo lipídico y movilización de lípidos.....	35
DISCUSIÓN	36
BIBLIOGRAFÍA.....	40
PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PREMIOS	48
Presentación de pósters.....	48
Premios y/o distinciones	48

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el aumento de proyectos de investigación orientados al estudio de los genomas de forma sistemática ha dado lugar a la aparición de nuevas tecnologías a gran escala que, en el caso de las proteínas, se denomina Proteómica. El término proteoma surge en 1994 para definir todas las proteínas que son expresadas por el genoma de una célula. El proteoma de un organismo es altamente dinámico, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimiento celular y estos, a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en el ambiente como situaciones de estrés, acción de fármacos, requerimientos energéticos o su estado fisiológico (normal o patológico). La posibilidad de identificar proteínas en forma global, surge gracias a la modernización de la espectrometría de masas (EM)¹. Esta técnica permite obtener y analizar gran cantidad de información reduciendo el tiempo necesario para determinar ciertas cascadas de señalización o de activación, tanto en células como en tejidos². El análisis proteómico requiere del uso de programas bioinformáticos para poder manejar la gran cantidad de datos obtenidos y realizar un análisis estadístico de los mismos. Estos programas utilizan algoritmos que seleccionan las características y utilizan diferentes tipos de validación cruzada para evaluar la fidelidad de los resultados.

Mediante estas técnicas modernas hemos podido analizar algunas de las proteínas que son moduladas, luego de tratar a células de una línea de carcinoma mamario con hemina. La hemina ($C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$) es un compuesto farmacológico que resulta de la unión de la protoporfirina IX con un átomo de hierro en su forma férrica. Se ha reportado que este compuesto posee un efecto antitumoral potente en cáncer de próstata, inhibiendo la formación de vasos sanguíneos y estimulando la respuesta inmune³.

A su vez, se ha descrito que la hemina induce la expresión y actividad de hemoxigenasa-1 (HO-1), por lo que es muy utilizada en el estudio de la activación de HO-1 en células normales y tumorales⁴⁻⁸.

Rol enzimático de Hemoxigenasa

La Hemoxigenasa (HO) es una enzima microsomal que cataliza la primera etapa limitante en la degradación del grupo hemo. Más exactamente cataliza la oxidación de uno de los carbonos que une dos de los cuatro pirroles en el anillo protoporfirínico (Fe-protoporfirina IX), el meso carbono α , llevando a la formación de cantidades equimoleculares de monóxido de carbono (CO), biliverdina y hierro libre, desempeñando un importante rol en el reciclado de este último ion^{9,10, 11,12, 13, 14}.

Existen dos isoformas de HO conocidas como hemoxigenasa-1 (HO-1) y hemoxigenasa-2 (HO-2) (Figura 1), producto de dos genes diferentes^{15,16}. HO-1 es una proteína de 32-kDa de expresión inducible. Su expresión es elevada en bazo e hígado, aunque también puede ser detectada en muchos otros tejidos¹². La isoforma 2, es una proteína de 36-kDa expresada en forma constitutiva en niveles altos en cerebro y en menores cantidades en testículos, endotelio, segmentos distales del nefrón, hígado y en el plexo

mesentérico intestinal^{15,17}. Esta isoforma está codificada por dos transcritos diferentes de un mismo gen, los cuales difieren en el uso de dos señales diferentes de poliadenilación¹⁸.

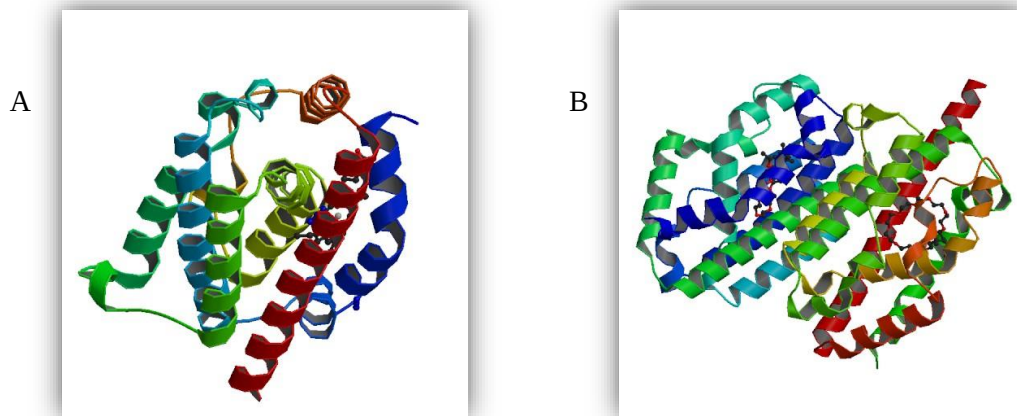


Figura 1: (A) Isoforma 1 de Hemoxigenasa. (B) Isoforma 2 de la enzima. Tomado del RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org, 1N45).

También se ha postulado la existencia de una tercera isoforma, HO-3, de 33-kDa muy similar a HO-2¹⁹. Sin embargo, HO-3 ha sido encontrada solo en rata y su presencia se ha demostrado solo a nivel de ARNm. Actualmente se considera que se trata de un pseudogen derivado del transcripto para HO-2²⁰.

La HO-1 es altamente inducible en respuesta a numerosos estímulos, generalmente relacionados al estrés celular y oxidativo, incluyendo su propio sustrato, shock térmico, especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), radiación UV, citoquinas inflamatorias, prostaglandinas, etanol y metales pesados. También puede ser inducida por hipoxia, pero este efecto parece ser dependiente en forma específica del tejido y la especie^{13,21-28}.

En relación al último punto es importante destacar que la hipoxia es un proceso frecuente durante el desarrollo tumoral. Se ha reportado que posiblemente el gen HO-1 es activado por un número de estímulos más grande que cualquier otro gen¹². Esta vasta cantidad de factores activa la expresión de la enzima a través de numerosas vías de señalización que finalizan, actuando sobre múltiples elementos de respuesta ubicados dentro del promotor del gen que la codifica. La regulación estricta de la enzima, sumado al hecho de la expresión de la misma en órganos no relacionados con el reciclaje metabólico del hierro y a su alta conservación entre especies muy diversas, sugiere fuertemente que HO-1 cumple funciones más amplias e importantes que la degradación del grupo hemo, ya destacable en sí misma. Seguramente el rol de protección de las células contra el estrés inflamatorio y oxidativo debe contarse entre estas funciones.

HO-1 en cáncer

Se ha encontrado evidencia que relaciona a HO-1 con el cáncer a diferencia de HO-2 para la cual esa evidencia es sumamente escasa^{12,17,29}.

La tumorigénesis es un proceso que está todavía lejos de ser completamente comprendido. Las investigaciones en el área de la biología del cáncer están descubriendo que la formación de un tumor maligno es el resultado de la acumulación clonal de células que presentan un conjunto de alteraciones genéticas y epigenéticas en los componentes moleculares de los circuitos que regulan su comportamiento normal. Estas alteraciones han sido clasificadas en lo que puede llamarse la “hipótesis de las capacidades adquiridas”^{30,31}. Dicha hipótesis postula que las alteraciones de los circuitos reguladores promueven, en las células normales, la adquisición de ocho “capacidades” y dos “características facilitadoras”, necesarias para transformarse en células cancerosas y completar la progresión tumoral. Las ocho capacidades son: activación anormal y permanente de señales proliferativas, evasión de señales supresoras del crecimiento y de la proliferación celular, evasión de la apoptosis, adquisición de inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, reprogramación del metabolismo energético, evasión de la respuesta inmune y activación de los mecanismos de invasión y metástasis. Las dos capacidades facilitadoras son: la inestabilidad genética, la cual provee la diversidad genética que acelera la adquisición de las ocho capacidades anteriores, y la inflamación que actúa como un importante promotor que facilita el surgimiento de las mismas (Figura 2).

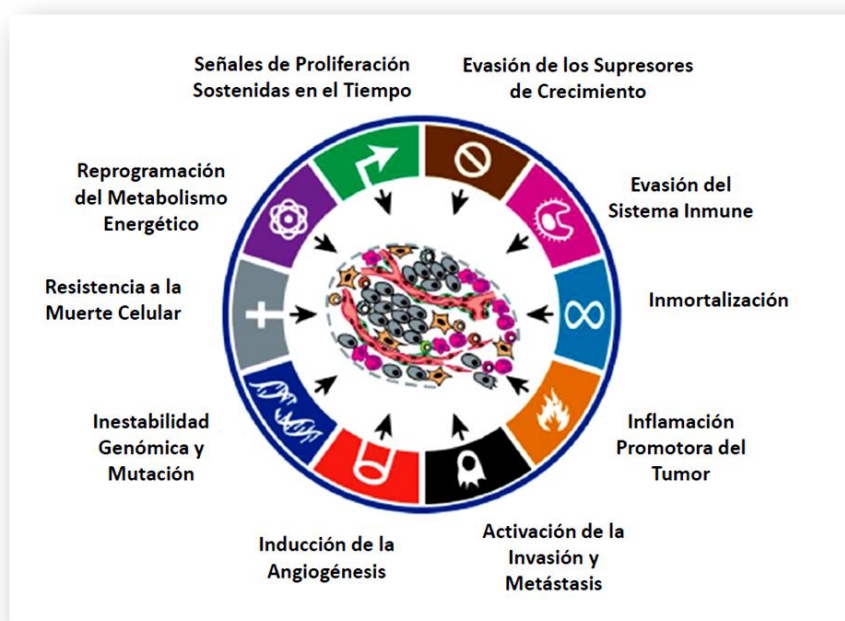


Figura 2: Capacidades y características facilitadoras necesarias para desarrollar un cáncer. Tomado y adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011³¹.

El cáncer de mama es el de mayor incidencia, mortalidad y prevalencia entre las mujeres a nivel mundial (IARC, GLOBOCAN 2018, <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>). En Argentina, es la primera causa de muerte por tumores en mujeres. Se producen 5.600 muertes por año por esta enfermedad y se estima que se producirán más de 19.000 nuevos casos por año, lo cual

representa el 16,8% del total de incidencia de cáncer en Argentina. Además, es el cáncer de mayor incidencia en mujeres, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres (IARC, GLOBOCAN 2018).

Se ha demostrado que varios carcinógenos que afectan a la glándula mamaria producen ROS (especies reactivas de oxígeno) y que el estrés oxidativo en células de este órgano estimula la proliferación celular y aumenta la resistencia a la apoptosis^{32,33}. En coincidencia, se ha considerado que un desbalance de enzimas antioxidantes contribuye considerablemente a la carcinogénesis mamaria y se ha reportado que moléculas antioxidantes tienen efectos antiproliferativos y proapoptóticos en células humanas derivadas de cáncer de mama^{34,35}. A pesar de estos importantes resultados y del conocido efecto antioxidante de HO-1, actualmente existen escasos estudios sobre la relación entre esta enzima y el cáncer de mama.

En este contexto es interesante investigar la importancia de HO-1 en este carcinoma en particular, ya que si bien se ha descripto que la enzima HO-1 tiene efectos específicos dependiendo del tipo celular tanto en tejidos normales como en tumores malignos, en la mayoría de las formas de cáncer investigadas la enzima ha demostrado tener un efecto promotor del desarrollo y la progresión tumoral¹⁴. Por el contrario, en el cáncer de mama, si bien se han realizado pocos trabajos previos, la conclusión general que se extrae de los mismos, es que en este carcinoma la enzima tiene un rol inhibidor del desarrollo y de la progresión tumoral^{6,36,37}.

Por otra parte, se ha notificado una fuerte expresión nuclear de la enzima HO-1 en varios tipos de cáncer, como en cáncer de próstata y en carcinoma mamario, siendo este último reportado recientemente por nuestro laboratorio donde se observa un rol antagónico de la proteína, de acuerdo al compartimiento celular donde se encuentre^{38,6}. Los mecanismos a través de los cuales HO-1 estaría relacionada con el cáncer y su rol nuclear en relación a esta enfermedad están lejos de ser dilucidados.

A su vez, se ha reportado, en líneas celulares y en tumores subcutáneos de ratón, que la localización nuclear de HO-1 se produce luego del tratamiento de las células con hemina^{6,8,39}.

Además, se ha descripto que la translocación de HO-1 al núcleo requiere la escisión de una porción de la proteína en el extremo carboxilo terminal, lo que permite que se libere de las membranas en las que se encuentra anclada. En este clivaje están involucradas proteínas como calpaínas y catepsinas. Consecuentemente, existirían dos formas de la proteína, la nativa de 32-kDa y la truncada de aproximadamente 28-kDa. La forma completa se encontraría mayormente en la membrana microsomal, en tanto la forma truncada migraría al núcleo^{4-6,39-41}. Se ha sugerido que HO-1 no ejercería su función enzimática en el núcleo, ya que cuando la proteína se encuentra en este compartimiento los niveles de hierro y bilirrubina no aumentan⁶. Las células sometidas a hipoxia, luego de tratarlas con hemina, muestran un aumento de la forma truncada de HO-1³⁹. Hasta el momento su función dentro del núcleo no ha sido dilucidada, aunque se ha postulado que podría actuar como un cofactor transcripcional³⁷.

Antecedentes previos de nuestro laboratorio, han demostrado mediante ensayos realizados con biopsias humanas, líneas celulares y modelos animales, que la enzima HO-1 tendría un rol inhibidor en la

evolución de la enfermedad. Se ha observado que el aumento de HO-1 en la línea celular LM3 de carcinoma mamario murino, disminuye la supervivencia celular debido posiblemente a un efecto pro-apoptótico de la enzima, tal como indica el aumento de células en la fase sub G0/G1 del ciclo celular⁶. El tamaño tumoral en ratones singeneicos disminuye luego de la inyección de hemina al tumor, sugiriendo que HO-1 produce una disminución del desarrollo tumoral. En cuanto al estudio de la expresión de la enzima en muestras humanas y su correlación con datos clínicos e histopatológicos, se ha reportado una correlación positiva entre el aumento de la expresión de HO-1 en los tumores y el aumento de la supervivencia global de los pacientes⁶. Asimismo, luego de la modulación con hemina de la enzima, se observa una disminución tanto en la migración como en la invasión de las células LM3, siendo estos resultados coincidentes con los reportados por Lin y colaboradores⁶.

En los procesos de adhesión, migración e invasión tumoral se encuentran involucradas tanto proteínas relacionadas con la adhesión celular como la integrinas y proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto.

Señalización desde la matriz extracelular

Las células pueden unirse a la matriz extracelular (MEC) utilizando receptores específicos denominados integrinas, los cuales conectan proteínas de la MEC como colágeno, fibronectina, vitronectina, etc. al citoesqueleto de actina⁴². Las integrinas pueden reclutar casi 900 proteínas para conformar estructuras denominadas adhesiones focales que son esenciales para la señalización intracelular. Durante la formación de las adhesiones focales se reclutan varias proteínas estructurales y reguladoras para la formación del complejo, como talinas, vinculina y quinasas entre otras⁴³.

La conexión entre la MEC, las integrinas y el citoesqueleto es altamente dinámico, lo que permite a las células adoptar rápidamente su forma característica e iniciar la migración⁴⁴.

Diversos procesos biológicos dependen de la habilidad de las células para reconocer la rigidez de la MEC. Por ejemplo, cuando la migración celular depende de la rigidez de la MEC se denomina durotaxis y se ha observado que células tumorales prefieren migrar de matrices laxas a matrices más rígidas, creando adhesiones focales más fuertes con mejor señalización⁴⁵.

La remodelación del citoesqueleto de actina depende de la actividad de las pequeñas Rho-GTPasas. Las GTPasas pequeñas tienen un rol crucial en múltiples procesos biológicos, desde la morfogénesis, polaridad, migración, desarrollo neuronal, división celular, adhesión, dinámica del citoesqueleto hasta procesos patológicos como el cáncer^{46,47}.

Dentro de la superfamilia de las GTPasas pequeñas RAS, se encuentra la familia de Rho-GTPasas compuesta en humanos por 20 miembros, los cuales se pueden dividir por su similitud y función. Los grupos más estudiados son RhoA, Rac1 y Cdc42, así como los que carecen de actividad GTPasa. Existe al menos un reporte que demuestra que el aumento de RhoA en el sarcoma de Kaposi, aumenta la

supervivencia celular y los niveles de proliferación y a su vez, promueve la expresión de los niveles de HO-1⁴⁸.

La actinmiosina es un complejo contráctil compuesto por actina y miosina que media la propagación celular y la adhesión a la MEC, generalmente a través de la formación de haces prominentes de actina fibrilar, las llamadas fibras de estrés. Estas estructuras finalizan en la cara interna de la membrana en ciertas áreas de contacto conocidas como adhesiones focales para formar una conexión entre la MEC y el citoesqueleto⁴⁹. Como se describió previamente las adhesiones focales son sitios de agrupación de integrinas transmembrana que consisten en muchas proteínas estructurales y de señalización⁵⁰. Durante la formación de las adhesiones focales se reclutan varias proteínas estructurales y reguladoras para la formación del complejo, como vinculina, zyxina, talinas, y proteínas con dominio LIM⁵¹. La vimentina ha sido reconocida como un jugador clave en la adhesión celular⁵².

Se ha descripto que las GTPasas pequeñas contribuyen con la mayoría de los pasos en la iniciación del cáncer y su progresión, incluyendo proliferación ilimitada, supervivencia, evasión de la apoptosis, invasión y metástasis. Se conoce que durante la invasión ameboidea o mesenquimal, los cambios de activación de las distintas GTPasas son determinantes^{53,544}. Las GTPasas alternan entre un estado activo, unido a GTP a un estado inactivo unido a GDP, estando la unión a GTP promovida por Rho-GEFs (factores intercambiadores de Guanina) que activan las GTPasas, incrementando la tasa de liberación del nucleótido unido y por lo tanto facilitando el intercambio de GDP por GTP. La hidrólisis es catalizada por Rho-GAPs (proteínas activadoras de GTPasas). La mayor parte de estas GTPasas se encuentran en estado inactivo unidas a su inhibidor Rho-GDI en el citoplasma y solo un pequeño porcentaje se encuentra activo y se localizan mayormente en la membrana celular⁵⁵ (Figura 3).

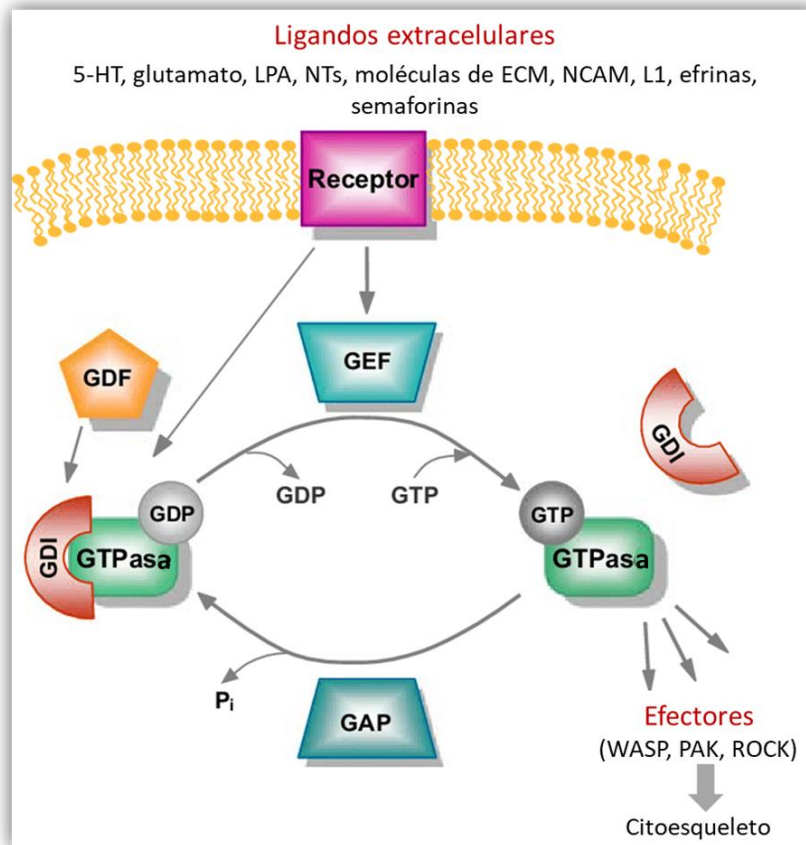


Figura 3: Mecanismo de activación de las GTPasas pequeñas, su activación por los factores intercambiadores de guanina (GEFs) y su inactivación por las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) a través de la hidrólisis de GTP a GDP. Tomado y adaptado de Ponimaskin, 2007⁵⁶.

La familia de proteínas GAPs, son fundamentales para controlar la activación de las GTPasas y se han visto formas mutadas en diversos tipos de tumores, así como involucradas en el proceso metastásico. Los GEFs pueden sufrir modificaciones transcripcionales o cambios en su localización sub-celular que regulan su actividad. Cualquier cambio dentro de este control tan minucioso en la activación de GEFs y GAPs puede derivar en respuestas patológicas. Estudios recientes han demostrado que un aumento de la expresión de GEF-H1 correlaciona con un aumento en la progresión tumoral⁵⁷⁻⁵⁹.

Los resultados preliminares de la Dra. Coló, realizados en el Max Planck de Alemania, demuestran por primera vez que GEF-H1 puede ser activado por integrinas y es dependiente de la clase $\alpha V/\beta 3$. Asimismo, GEF-H1 se encuentra mayormente expresado en células de carcinoma mamario invasivas y en biopsias de cáncer de mama humanas.

Dependiendo del tipo celular y la señalización desde la matriz extracelular en el momento que una célula es capaz de desprenderse del tumor, migrar e invadir para iniciar el proceso de la metástasis, ocurren distintos cambios de expresión y localización de proteínas, que inducen una remodelación completa de esta célula. Trabajos previos realizados por la Dra. Coló, han descrito que los cambios en la expresión de integrinas y de las proteínas que forman parte de las adhesiones focales, están directamente relacionados a los cambios en migración e invasión celular durante la metástasis tumoral⁶⁰⁻⁶³.

El Citoesqueleto celular, su rol en la migración celular y en el cáncer

La metástasis es la principal causa de las muertes que ocurren por cáncer. Ésta se produce como resultado de la migración de las células tumorales del tumor primario hacia regiones distantes de otros órganos del cuerpo y tal como mencionamos anteriormente, esta es una de las capacidades adquiridas para el desarrollo del cáncer (activación de la invasión y metástasis)^{64,65}. La capacidad de moverse hacia otros sitios requiere de la reorganización del citoesqueleto^{63,66}. Los tres filamentos que lo componen son los filamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos. En conjunto le otorgan a la célula su forma y estructura y además, son muy importantes en diversas funciones celulares como son la endocitosis, división celular, el movimiento vesicular y el movimiento celular. Se conoce que HO-1 modula varios genes relacionados con la locomoción y motilidad celular, especialmente aquellos involucrados en la adhesión a la matriz extracelular. En relación a esto, se ha visto que el aumento de la expresión de HO-1 en células de carcinoma prostático aumenta la adhesión célula a célula y disminuye las estructuras celulares que le permiten migrar, mostrando un fenotipo más adhesivo y menos invasivo^{67,68}.

Además de la abundante literatura sobre la participación del citoesqueleto de actina en la migración, invasión y metástasis de las células tumorales, existe evidencia creciente que destaca el sistema de microtúbulos en estos procesos. De hecho, una serie de vías de señalización como la vía Rho-GTPasa es común tanto para los microtúbulos como para los filamentos de actina, en términos de la regulación del movimiento celular y otros eventos celulares. En efecto, aunque a menudo se estudian independientemente, estos dos sistemas citoesqueléticos están regulados de forma coordinada. Se ha descrito que un activador de las RhoGTPasas, GEF-H1, se encuentra unido a microtúbulos y a su vez regula el citoesqueleto de actina a través de la GTPasa RhoA⁶⁹. De esta manera, GEF-H1 se encuentra asociado a la migración celular, modificando el citoesqueleto de actina y estabilizando el citoesqueleto de tubulina, procesos importantes en la metástasis celular^{70, 71,72}.

Rol de la HO-1 en el metabolismo del hierro

Se ha descrito que la hemina, a través de un aumento de los niveles de HO-1 y la consecuente degradación del grupo hemo, podría estar participando en el metabolismo del hierro¹². El metabolismo del hierro podría ser un vínculo entre la hemoxigenasa y el cáncer de mama, ya que la interrupción de la homeostasis del hierro en células de cáncer de mama ha sido reportada por varios autores^{73,74}. El regulador clave del ciclo del hierro se llama hepcidina, quien induce la internalización y degradación de la ferroportina a fin de regular el almacenamiento de hierro y su absorción duodenal⁷⁵. En las células duodenales, otra proteína vinculada con el hierro es el transportador de metales divalentes 1 (DMT1). DMT1 es una proteína transmembrana importadora de hierro que se ha identificado en los tejidos donde

se produce una mayor absorción de hierro, incluidas las células duodenales y hepáticas⁷⁶. En células de cáncer de mama, Jiang y colaboradores han identificado el ARNm de DMT1⁷⁷. Sin embargo, la expresión proteica y la localización subcelular de DMT1 en el cáncer de mama no se han aclarado de manera concluyente. Otro transportador de iones metálicos transmembrana es la proteína 14 similar a ZRT-IRE (ZIP14). En las células HEK 293H, ZIP14 está involucrado en la absorción de hierro, tanto del unido a transferrina, como del no unido a transferrina⁷⁸. La relación entre la expresión de ZIP14 y el cáncer ha sido descrita recientemente por Zhao y colaboradores en células HepG2; quienes reportaron que la expresión de ZIP14 está regulada por el supresor tumoral p53⁷⁸.

El control del metabolismo del hierro es muy relevante para la fisiología celular, dado que es un micronutriente esencial, necesario para casi todas las células vivas⁷⁹. Es requerido por un gran número de enzimas hemo y no hemo, que tienen funciones fundamentales en el transporte de oxígeno y la fosforilación oxidativa⁷⁶. Además, el hierro es un cofactor de la ribonucleótido reductasa, enzima clave para la síntesis de ADN. Por lo tanto, el hierro está directamente asociado con la proliferación celular. Sin embargo, el hierro también es potencialmente tóxico porque, en condiciones aeróbicas, cataliza la formación de ROS a través de la reacción química de Fenton^{80,81}. Por lo tanto, cuando el hierro está en exceso, la proteína ferritina lo almacena, como un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo en varias células⁸¹. Aunque en el cáncer de mama se ha descrito la interrupción de la homeostasis del hierro y el papel de HO-1 como una proteína pro-apoptótica y antiproliferativa, la relación funcional entre la hemina, HO-1 y el ciclo del hierro no se ha aclarado completamente^{73,74,6}. Además, el papel del hierro tanto en la progresión tumoral como en la muerte celular no se ha determinado claramente en el cáncer de mama. De hecho, algunos autores han descrito que el aumento de los niveles de hierro intracelular puede promover la proliferación, mientras que otros han descrito que el hierro puede promover la muerte celular^{73,74,82}. Por lo tanto, el estudio del papel de las proteínas claves de hierro en el cáncer de mama y su relación con la función HO-1, ayudará a comprender mejor los mecanismos moleculares responsables de la regulación anormal del hierro en las células de cáncer de mama.

Rol de la HO-1 en el metabolismo de los lípidos

En los sistemas biológicos, las disrupciones en la homeostasis redox son causadas por la acumulación de especies oxidantes, ya sea por sobreproducción de las mismas o por fallas en los sistemas encargados de reducirlas. El exceso de estos agentes puede oxidar el ADN, las proteínas y los lípidos alterando la estructura, actividad y propiedades físicas de una célula u organismo. Cada vez más se centra la atención en el papel de los hidroperóxidos lipídicos como mediadores críticos de estos sucesos⁸³. Como compuestos altamente reactivos, los peróxidos lipídicos también son capaces de propagar más generación de ROS⁸⁴.

Debido a su reactividad y capacidad de generar segundos mensajeros, los peróxidos lipídicos han sido reconocidos como un factor crítico en la progresión y regulación de la inflamación^{85,86}. Cabe destacar

que la inflamación es promotora de la tumorigénesis, una de las capacidades anteriormente descritas para generar un tumor^{30,31}. Trabajos recientes han identificado a la peroxidación lipídica como la principal causa de la ferroptosis, un tipo de muerte celular no apoptótica dependiente del hierro, la cual se caracteriza por la acumulación de peróxidos lipídicos. La ferroptosis puede ser suprimida por antioxidantes lipofílicos y quelantes del hierro, pero no es afectada por inhibidores de la apoptosis o necrosis^{87,88}.

Para protegerse del estrés oxidativo inducido por ROS, la célula viva ha desarrollado una amplia batería de sistemas de defensa que incluyen los antioxidantes enzimáticos (por ejemplo, superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasas y hemoxigenasa) y los antioxidantes reguladores de redox no enzimáticos (por ejemplo, glutatión y vitamina C)⁸⁹. Es sabido que un aumento de la peroxidación lipídica genera un aumento de la expresión de HO-1⁹⁰.

Por otro lado, hay trabajos que demuestran que ciertos fosfolípidos bioactivos como esfingosina-1-fosfato (S1P) y ceramida-1-fosfato (C1P) presentan un rol en mecanismos como migración e invasión celular en células de leucemia cuando la expresión de HO-1 se encuentra disminuida⁹¹.

MATERIALES Y MÉTODOS

La implementación de nuevas técnicas bioinformáticas y de proteómica nos ayudan a dilucidar rápidamente distintas cascadas de señalización, luego de estimular con hemina a células de carcinoma mamario murino. A partir de los resultados obtenidos hemos analizado algunas de las rutas involucradas utilizando ensayos bioquímicos, a fin de corroborar la validez del análisis bioinformático.

Estudios en biopsias humanas

Con el objeto de reforzar los estudios realizados por proteómica, se realizaron estudios inmunohistoquímicos a partir de muestras tumorales provenientes de secciones histológicas de biopsias humanas. Estas muestras de biopsias, realizadas con fines de diagnóstico, pertenecen al banco de tumores del Laboratorio de Biología del Cáncer y provienen de varios hospitales de la ciudad de Bahía Blanca, cuyos comités de ética y de investigación y docencia han aprobado los protocolos correspondientes. Parte del material de este banco de tumores consiste de cortes histológicos (5 μ m) realizados a partir de los tacos de parafina conteniendo los tejidos provenientes de las biopsias, que son usualmente conservados en los servicios de patología de estos hospitales. De este banco se utilizaron para el presente estudio, 58 biopsias de carcinoma mamario. Una sección de cada muestra fue teñida con hematoxilina y eosina y el diagnóstico inicial fue confirmado por un patólogo. Además, se evaluó la calidad de los cortes, prestándose atención tanto a la fijación adecuada del material como a la presencia de zonas con lesión representativa. Las mismas fueron diagnosticadas como carcinomas ductales o ductolobulillares. Las pacientes a las que se les realizaron las biopsias de las cuales se obtuvieron estas muestras, no recibieron tratamiento previo a la realización de las mismas. Se disponían de los siguientes datos clínicos patológicos: edad, tamaño del tumor, metástasis axilar, estado hormonal, status, grado histológico y receptores hormonales.

INMUNOHISTOQUÍMICA:

Para realizar la técnica de inmunohistoquímica, se cortaron secciones de 5 μ m, se desparafinaron con xileno y se rehidrataron con etanol de graduación decreciente (100%, 96% y 70%). La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó incubando por 15 min con H₂O₂ al 3% en alcohol 96°. Luego se realizaron tres lavados con PBS 1X y se bloquearon los sitios inespecíficos con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% en PBS 1X por 30 min a temperatura ambiente. Con el fin de estudiar la expresión de las proteínas HO-1 y GEF-H1, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo HO-1 (SPA-896 Assay Designs Streessgen) y con el anticuerpo policlonal de conejo GEF-H1 (Abcam 155785) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda (dilución 1/75 en BSA 2% para HO-1 y 1/500 en BSA 2% para GEF-H1, PBS 1X). Para el caso particular de GEF-H1 se realizó recuperación de epítopes con buffer EDTA pH 9.0 a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente a la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados en PBS 1X, y luego se incubó con un anticuerpo secundario

biotinilado anti IgG de conejo (Vector Laboratories) por 30 min a temperatura ambiente. Luego de esta incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X. A continuación, se incubó con el reactivo estrepto-avidina conjugada con peroxidasa (VectaStain AB) por 30 min. Por último, empleando 3,3'-diaminobencidina (DAB) (Sigma) como sustrato de la reacción de la inmunoperoxidasa, se visualizaron los antígenos de interés. Esto se debe a la formación de un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el sistema de anticuerpos. Posteriormente se realizó la coloración de contraste con hematoxilina según Harris y se deshidrató a través de una serie de alcoholes de graduación creciente y xileno como intermediario del medio de montaje. Finalmente, los cortes fueron montados con Permount (Fisher Scientific) para su estudio bajo microscopio. En cada ensayo de inmunohistoquímica se procesaron controles negativos y positivos. Para el caso de los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por una inmunoglobulina del mismo isotipo. Para el caso de los controles positivos se realizó una IHQ para GEF-H1 en una sección de amígdala y para el caso de HO-1 se emplearon cortes de bazo.

Evaluación de la inmunomarcación y análisis estadísticos

Los niveles de expresión de HO-1 y GEF-H1 analizados por IHQ se cuantificaron utilizando el índice de cuantificación inmunoreactivo (immunoreactive score, IRS), el cual se calculó multiplicando la intensidad de la marcación (0: sin marcación; 1: débil; 2: moderada y 3: fuerte), por el porcentaje de células positivas para la proteína.

Para el caso de HO-1: 0: equivale a menos del 10% de células inmunomarcadas; 1: corresponde al rango entre 11 y 50% de células inmunomarcadas; 2: del 51 al 80% y 3: más de 81% de células inmunomarcadas. Para la semicuantificación de la expresión de GEF-H1: 0: menos del 10% de células inmunomarcadas; 1: del 11 al 25%; 2: del 26 al 50%; 3: del 51 al 75% y 4 mayor al 76%. Se determinó para cada muestra el IRS promedio de 10 campos elegidos al azar (400x).

Para estimar el valor de corte del IRS para HO-1 y GEF-H1 en carcinoma mamario, se trazaron las curvas características de funcionamiento del receptor (ROC). Las áreas bajo la curva (AUC), fueron comparadas usando varios valores posibles de corte. Para HO-1, el AUC del modelo con IRS= 1 fue 0,658 (intervalo de confianza (IC) 95%= 0,55–0,77), con una sensibilidad del 55,2% y una especificidad del 77,8% para el punto más cercano a [0.0, 1.0]. Para GEF-H1, el AUC del modelo con IRS= 1 fue 0,779 (IC 95%= 0,59-0,96), con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 67% para el punto más cercano a [0.0, 1.0]. Según el área bajo los valores de la curva ROC, el mejor valor de corte se determinó como IRS= 1, tanto para HO-1 como para GEF-H1. Valores de IRS mayores a 1 se consideraron que mostraban una expresión positiva para ambas proteínas. Todos los puntajes se ingresaron en el sistema electrónico estandarizado Excel para Microsoft Windows.

CORRELACION CON DATOS CLINICOS HISTOPATOLÓGICOS:

Los resultados de la expresión de las proteínas obtenidos por inmunohistoquímica, esto es, los datos de presencia o ausencia, de semicuantificaciones con el “immunoreactive score” (IS) y de localización subcelular, se correlacionaron con los varios datos clínicos e histopatológicos del banco de tumores. Se estableció si estos datos de expresión presentan una asociación con el grado de diferenciación, el índice mitótico, grado nuclear, estadio de la enfermedad, con la invasión linfática o con la presencia de metástasis. Además, se pudo definir si se asocia a la expresión de los receptores hormonales. Estos estudios se realizaron únicamente para GEF-H1, debido a que la correlación de estos datos clínicos patológicos ya fueron publicadas por nuestro grupo para el caso de HO-1⁶.

Estudios con cultivos celulares

Se utilizó para los experimentos la línea celular de carcinoma mamario murino LM3, gentilmente cedida por el Instituto de Oncología Dr. Ángel H. Roffo. Las células fueron mantenidas en estufa de cultivo a 37°C con atmósfera 5% CO₂. Se cultivaron en Medio Esencial Mínimo (MEM, INVITROGEN) suplementado con 5% de suero fetal bovino (NATOCOR) y 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO).

PREPARACIÓN DE LA SOLUCION STOCK DE HEMINA:

Se disolvieron 36 mg de hemina (SIGMA) en 0,4 ml de una solución de NaOH 0,5 N. Se agregó 0,5 ml de una solución de tris-HCl 1 M pH 8, se filtró utilizando filtros de 0,2 µm. La solución de hemina se conservó en alícuotas a -70°C al resguardo de la luz. Previo a su uso, la solución de hemina se diluyó en PBS 1:100⁹².

Para el control-vehículo se prosiguió de la misma manera que la solución de hemina, sin el agregado de la droga.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS:

Las células de carcinoma mamario murino (LM3) fueron tratadas farmacológicamente con hemina 80 µM y su respectivo control. Se procesaron cuatro replicas para cada condición. Las muestras, luego de 24 h de tratamiento en la oscuridad, fueron lisadas en buffer de lisis (100mM Tris-HCl, a pH 7.5, conteniendo SDS 4% y dithiothreitol 100 mM), se calentaron 5 min a 95 °C y fueron sonicadas. El lisado total fue centrifugado por 10 minutos a 16.000g para separar las membranas que quedaran en el pellet, de las proteínas solubles. Éste fue luego cuantificado con Bradford para determinar la cantidad de proteínas y hervido por 5 min con buffer Laemmli. Las proteínas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida SDS-page, para separarlas por peso molecular. Luego se enviaron al Instituto Max Planck de Bioquímica en Alemania para su extracción y análisis en el Espectrómetro de Masas. Las proteínas fueron extraídas del gel y se trataron con las enzimas Tripsina y Lisina C para obtener los péptidos que fueron sometidos al espectrómetro de masas de alta sensibilidad nanoLC/MS/MS y resolución LTQ-Orbitrap, espectrómetro equipado con una fuente de nanoelectrospray (Thermo Fisher Scientific).

Además, durante el análisis se estableció como condición de restricción que tres de la cuatro replicas fueran coincidentes para cada condición. Empleando el programa bioinformático Perseus, se seleccionaron aquellas proteínas que fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre el tratamiento y su control luego de aplicar el test de ANOVA dos vías.

Los resultados obtenidos los procesamos con el programa bioinformático Perseus, desarrollado en el Max Planck de Bioquímica, por el Dr. Cox. y el programa de libre acceso STRING para generar las redes de proteínas asociadas tanto por interacción o modulaciones descritas en ensayos publicados. STRING es parte de la infraestructura de ELIXIR que en su consorcio se encuentran los repositorios SIB (Swiss institute of bioinformatics); Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research) (CPR NNF) y European Molecular Biology Laboratory (EMBL).

WESTERN BLOT:

Lisis celular

Para el estudio de la expresión de HO-1 y GEF-H1, se sembraron células de la línea LM3 en una densidad de $5,0 \times 10^4$ células/cm² en placas de 100 mm de diámetro. Cuando la monocapa celular logró una confluencia del 75-80%, se trataron con hemina 80 μ M durante 24 h. Después de exponer las células a los tratamientos, las mismas fueron lavadas en PBS 1X y levantadas de la placa de cultivo con buffer de lisis, con el agregado del cóctel inhibidor de Proteasas Set III Calbiochem®, incubándose con este buffer por 30 min a 4°C. Se utilizó una alícuota para medir concentración de proteínas por el método de Bradford y el resto fue almacenado a -70°C hasta su uso⁹³.

Medición de la concentración de proteínas

La medición se realizó tomando una alícuota de 2 μ l del lisado celular en 998 μ l de la solución de Bradford. Por cada medición de concentración de proteínas se procesó una curva de calibrado utilizando como estándar BSA 1 mg/ml. Antes de la lectura la solución se agitó por 10 segundos y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm.

Desnaturalización de las proteínas

Se calcularon las concentraciones de las proteínas y se llevaron a igual volumen con buffer de lisis. Se utilizó el método de Laemmli para desnaturalizar las proteínas (0,3 M Tris-Hcl pH 6,8, 10% SDS, 25% Glicerol, 0,05% Bromofenol azul, 10% Betamercaptoethanol)⁹⁴. Las muestras, luego del agregado del buffer, fueron calentadas en baño de agua a 95°C durante 5 min. Se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas se separaron por su peso molecular en un gel de poliacrilamida 10-15% (según el tamaño molecular de la proteína en estudio). Las muestras se calentaron en baño de agua a 95°C por 5 min antes de ser sembradas. Se sembraron en gel cantidades equivalentes de proteína (50 μ g). La electroforesis se realizó a amperaje constante (40 mA hasta el apilamiento de las proteínas entre el gel de apilamiento

con el gel separador y 60 mA en el gel separador). El tiempo de duración de la electroforesis fue de 1 h 30 min.

Transferencia a membranas de PDVF

Concluida la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PDVF (Invitrogen) a amperaje constante, 300 mA, durante 1 h 30 min en buffer de transferencia (Tris-base 3 g, Glicina 14,4 g, Metanol 200 ml, agua tipo MilliQ hasta 1000 ml). Luego de la transferencia, las membranas se lavaron en buffer PBS 1X por 5 min. Se incubaron las membranas en una solución de leche descremada al 5% en buffer PBS 1X pH 7,4 durante 30 min en agitación a temperatura ambiente y se siguió con la detección de las proteínas de interés.

Detección de proteínas de interés

Para realizar la detección de las proteínas, las membranas se incubaron con diferentes soluciones de anticuerpos. Las diluciones de los anticuerpos primarios se realizaron en buffer de bloqueo (BSA 3% en PBS 1X pH=7,4). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: para la detección del antígeno GEF-H1 se empleó un anticuerpo policlonal anti GEF-H1, dilución 1/2000, obtenido en conejo (Abcam 155785); para la detección del antígeno HO-1 se utilizó anti-HO-1 policlonal, obtenido en conejo SPA-896 (Assay Designs, Streessgen); para la detección de la actina se utilizó anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), dilución 1/1000; para tubulina se utilizó anti-tubulina, dilución 1/1000 y para la detección de GAPDH (MERK, CB 1001) anti-GAPD, dilución 1/5000; todos obtenidos en ratón. Los anticuerpos secundarios-HRP conjugados (Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody) fueron obtenidos de Amersham (GE Healthcare). Para las inmunofluorescencias se emplearon los anticuerpos secundarios anti-conejo, conjugados con el fluorocromo Alexa 566 (Molecular Probes, Invitrogen), dilución 1/2000 y el anti-cabra Ig FITC (SC-2777, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Las membranas se incubaron por separado con las distintas soluciones de anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Después de realizar lavados con buffer PBS-Tween 0,01%, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios en leche descremada al 5% en buffer PBS 1X pH=7,4 (diluidos en buffer de bloqueo) por 1 h en agitación a temperatura ambiente. Luego de esta incubación las membranas fueron lavadas con buffer PBS-Tween 0,01%. Para la visualización de las proteínas se empleó el kit de detección ECL (Amersham GE). La determinación de la expresión de actina y GAPDH fue utilizada como control de la cantidad de proteínas cargadas en el gel. Las bandas fueron cuantificadas densitométricamente usando el programa Image-J 1.38 (Wayne Rasband National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/java 1.6.0 02>).

INMUNOFLUORESCENCIA:

Se sembraron células LM3 sobre cubreobjetos previamente esterilizados en placas de cultivo de 2,5 cm. Cuando las células lograron un 75-80% de confluencia, se las trató con hemina 80 µM durante 24 h para el estudio de la expresión de proteínas del citoesqueleto. Luego se realizaron tres lavados con buffer

PBS 1X. Las células se fijaron con solución de paraformaldehído al 4% por 10 min a temperatura ambiente y luego fueron permeabilizadas con una solución al 0,1% de Triton X-100 (SIGMA) en PBS 1X por 15 min. Posteriormente a la permeabilización y a efectos de prevenir las uniones no específicas del anticuerpo y obtener una señal más limpia al momento de observar nuestra muestra en el microscopio de fluorescencia, se realizó un **bloqueo con BSA** al 1% en PBS 1X, por 1 h a temperatura ambiente.

Luego, se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-talina (1/100) y anti-tubulina-Cy3 (1/300) durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Para detectar los filamentos de actina, utilizamos Faloidina-TRICT (1/300) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X y se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo Alexa 566 (1/500) (Molecular Probes, Invitrogen) por 1 h a temperatura ambiente. Se incubó por 10 min con DAPI (1/10000) en PBS 1X finalizando con el montado de los cubreobjetos sobre portaobjetos para su posterior visualización en microscopio de fluorescencia. Las inmunofluorescencias se visualizaron utilizando un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) equipado con una cámara AxioCamMRm.

ENSAYO DE MIGRACIÓN:

La migración celular fue estudiada mediante el ensayo de la herida. Las células LM3 fueron sembradas en placas de Petri de 35-mm y cultivadas hasta lograr confluencia. Las células fueron tratadas con hemina (20 μ M) o vehículo, la herida fue realizada con un tip de una micropipeta de 200 μ L, generando una línea en la monocapa. Se fotografió cada 12 h durante un periodo total de 24 h. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-S) equipado con una cámara digital (Nikon Coolpix s4). Se midió y cuantificó el área descubierta para cada tratamiento a distintas horas (0, 12, 24) con Image-J y se comparó entre tratamientos.

EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA:

Para extraer los lípidos a partir de cultivos de células LM3, se rasparon las placas de cultivo y se homogeneizaron las células en volúmenes conocidos de cloroformo:metanol 1:2 (v/v) en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem con pistón de Teflón®⁹⁵. Los homogenados se dejaron durante toda la noche a 4°C en dicho solvente. Luego se les agregó un volumen de cloroformo y 1.8 volúmenes de agua, alcanzando una proporción final de cloroformo:metanol:agua 2:2:1.8 (v/v). Los tubos se agitaron vigorosamente en vórtex y se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 rpm en una centrífuga de mesa Beckman TJ-6 para separar las fases. Luego de separar la fase superior metanólica-acuosa, se recuperó la fase inferior clorofórmica conteniendo los lípidos. Los extractos lipídicos así obtenidos se secaron bajo corriente de N₂, se resuspendieron en volúmenes conocidos de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso.

Para estimar el contenido de fosfolípidos se tomaron alícuotas para determinar el contenido de fósforo lipídico total por el método de Turner y Rouser ⁹⁶. Luego se sembró una cantidad fija de fósforo lipídico de cada extracto en placas de HPTLC (del inglés high performance thin-layer chromatography) de 10x20

de sílica gel G y se resolvieron las distintas clases lipídicas utilizando los siguientes sistemas de solvente en forma secuencial: cloroformo:metanol:ácido acético:agua (50:37.5:3.5:2, v/v/v/v), hasta la mitad de la placa y luego hexano:éter (80:20, v/v) hasta el frente. Seguidamente, para la visualización de las bandas se expuso la placa a vapores de yodo y se identificaron los lípidos mediante el uso de estándares adecuados preparados en el laboratorio de lípidos del INIBIBB.

Estudios en Modelos animales

Se utilizó material incluido en parafina del modelo animal obtenido previamente en el laboratorio, que describimos a continuación:

MODELO DE IMPLANTE SUBCUTÁNEO DE CÉLULAS LM3 EN RATONES SINGENEICOS BALB/C:

Para la obtención de este modelo se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/C. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de luz/oscuridad de 12 h cada uno y con acceso a alimento y agua *ad libitum*.

En este estudio empleamos 30 ratones hembras, los cuales fueron divididos en 2 grupos de 15 animales. A los 70 días de edad se les administraron por vía subcutánea 4×10^5 células LM3 en el flanco derecho de los animales, utilizando una jeringa monoject 200. A la semana de inocular las células tumorales, los animales fueron inyectados con el inductor de HO-1 (hemina, 35 µg/kg de peso). Los tratamientos con hemina se realizaron dos veces por semana durante 3 semanas y la aplicación de la droga fue intratumoral. De manera similar se procesó el grupo control. En cada aplicación se midió el tamaño del tumor con calibre. Luego de las 6 aplicaciones del inductor, se sacrificó a los animales bajo una atmósfera de CO₂, según las recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación (http://www.upei.ca/humanres/files/humanres/ExperimentalAnimals_GDL.pdf). Los tumores resecados se volvieron a medir y se destinaron para su posterior procesamiento por las técnicas histológicas. Para analizar el volumen de los tumores obtenidos en ambos grupos se empleó la fórmula $V = L \times W^2/2$, en donde V es el volumen, L representa la dimensión más extensa y W la medida más corta.

Estadística:

Se utilizó el software GraphPad Prism versión 8.00 para la recolección, procesamiento y análisis estadístico de todos los datos. En el análisis del ensayo de migración se empleó el test ANOVA a dos vías. El análisis de los IRS entre los diferentes grupos se realizó con el test U de Mann-Whitney. La correlación entre los datos obtenidos de las historias clínicas y los niveles de expresión GEF-H1 se realizó con el test Chi cuadrado. Los datos obtenidos por EM fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías. Para todas las condiciones se consideró un valor de $p < 0,05$ como significativo.

RESULTADOS

Cambios en la expresión de proteínas observados por análisis proteómico luego de la modulación farmacológica con hemina en la línea celular LM3

La hemina es un modulador de la expresión y actividad de HO-1, es por esta razón que se utiliza como método indirecto para estudiar los efectos que tiene HO-1 sobre otras proteínas. Sin embargo y hasta donde sabemos, existe en la literatura al menos un reporte indicando que esta protoporfirina puede tener efectos biológicos independientes a la modulación de HO-1, por esta razón los resultados son presentados en base a la acción de la hemina y no de HO-1⁹⁷.

Para comenzar a interpretar el mecanismo de acción de la hemina en cáncer de mama y su posible acción sobre otras proteínas, procedimos a hacer lisados celulares de la línea celular de carcinoma mamario murino LM3, que habían sido estimuladas con hemina 80 μ M o con su control (vehículo).

Mediante el análisis de espectrometría de Masas detectamos 7292 proteínas, de las cuales 5639 fueron moduladas luego del tratamiento con hemina respecto al control. De estas últimas, solo 595 proteínas aumentaron su expresión significativamente y 353 la disminuyeron ($p < 0,05$; ANOVA dos vías) (Figura 4A). En la figura 4B se muestran los geles de poliacrilamida SDS-Page con los lisados de las proteínas teñidas con Coomassie blue que fueron aislados y digeridos con Lisina C y tripsina, para obtener los péptidos, que luego se sometieron al espectrómetro de masas. Del grupo de proteínas que aumentaron luego del tratamiento con hemina, se identificaron dos conjuntos importantes de proteínas: uno involucrado con el metabolismo del hierro, entre ellas HO-1, y un segundo relacionado con el metabolismo de los lípidos. Dentro del grupo de proteínas cuya expresión disminuyó luego del tratamiento con hemina, observamos dos conjuntos de proteínas destacables: aquellas pertenecientes al citoesqueleto y las proteínas relacionadas con la biogénesis de los ribosomas (Figura 4C). A partir de estos resultados se comenzó con el análisis de datos correspondiente para entender la interacción de estos conjuntos de proteínas y su relevancia en cáncer de mama.

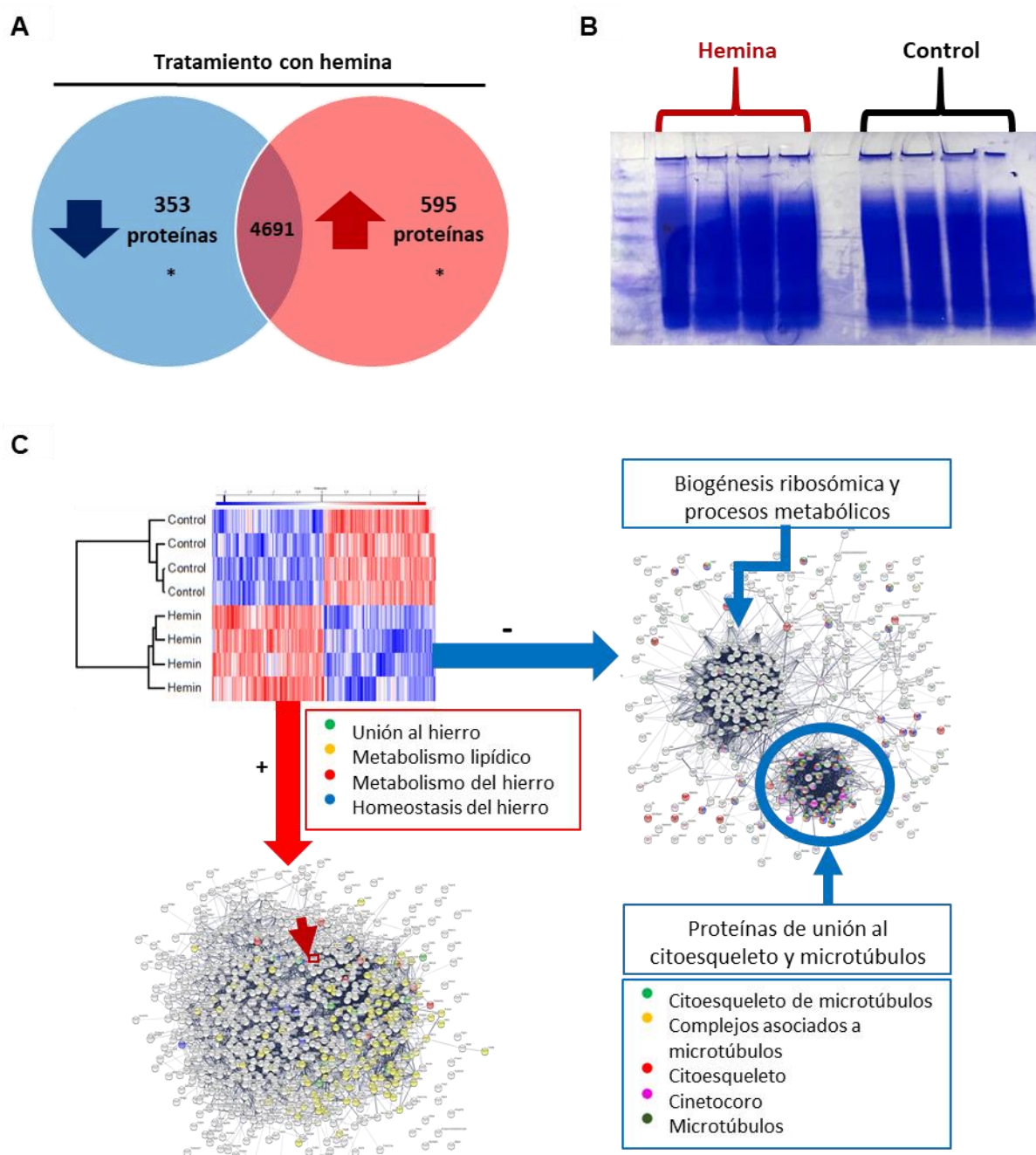


Figura 4: (A) Estudios de proteómica por espectrometría de masas en lisados de la línea celular LM3. Luego del tratamiento con hemina, se observó que 595 proteínas presentaban sobreexpresión y 353 disminuyeron su expresión (* $p < 0,05$; ANOVA dos vías). (B) Gel de poliacrilamida conteniendo los lisados celulares LM3 tratados con hemina y con vehículo, teñidos con Coomassie blue. (C) Grupos de proteínas que aumentaron (rojo), que no variaron (blanco) y que disminuyeron su expresión (azul) luego del tratamiento con hemina. Dentro del grupo de proteínas que aumentaron su expresión con respecto al control se observan proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro y lípidos, y dentro del grupo de proteínas cuya expresión fue disminuida respecto al grupo control, se destacan aquellas proteínas vinculadas a la modulación del citoesqueleto y las relacionadas a la biogénesis ribosomal.

HO-1 se encuentra sobreexpresada en la línea celular LM3 luego de la modulación farmacológica con hemina y en biopsias humanas de cáncer de mama

En nuestro análisis de proteómica hemos observado efectivamente que hay un aumento de la expresión de HO-1 cuando la línea tumoral de carcinoma mamario es tratada con hemina, comparada con su respectivo control (Figura 5A). Este mismo resultado lo hemos corroborado mediante Western blot (Figura 5B). Nuestro laboratorio, entre otros, reportó que HO-1 se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de tumores, tales como glioma⁵, carcinoma celular escamoso⁴, cáncer mamario⁶ y colorrectal⁴¹. También demostramos, para el cáncer de mama humano, que su expresión se asocia con una disminución de la progresión tumoral y menor número de metástasis en nódulos linfáticos⁶. Con el objeto de aportar más evidencia de la expresión de HO-1 en los tejidos tumorales con respecto a los tejidos adyacentes no malignos, se realizaron ensayos de expresión por inmunohistoquímica (IHQ) empleando 55 nuevas biopsias de carcinoma mamario humanas que presentaban, en 12 de ellas, zonas adyacentes no malignas. La expresión de HO-1 se evaluó mediante el empleo del IRS y se analizaron los resultados con la prueba U de Mann Whitney, según se detalló en la sección de materiales y métodos. El estudio por IHQ mostró que la expresión de la proteína se encuentra aumentada con respecto al tejido adyacente no maligno (Figura 5C). Efectivamente, se observaron diferencias significativas en la expresión de la proteína cuando se compararon las áreas tumorales con respecto a las zonas adyacentes no malignas ($p=0,0249$; Figura 5C). Estos resultados corroboran la sobreexpresión de HO-1 en el carcinoma mamario en comparación a las áreas no malignas adyacentes.

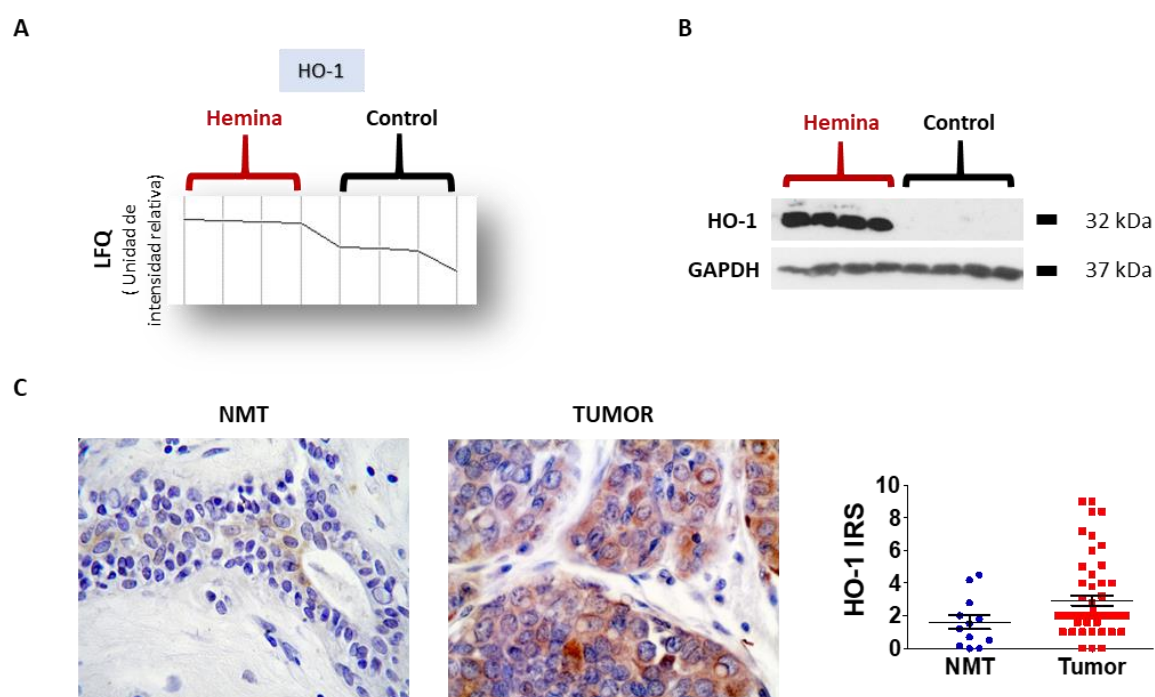


Figura 5: (A) Análisis de los niveles de expresión de HO-1 mediante el software Perseus a partir de la espectrometría de masas (EM) realizada en la línea celular LM3 luego del tratamiento con hemina. (B) Western blots de los lisados celulares utilizados para EM y detectados con el anticuerpo específico para HO-1. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico para GAPDH. (C) Imágenes representativas de biopsias humanas de carcinoma mamario donde se observa la expresión de HO-1 por inmunohistoquímica en zona tumoral y zona adyacente no maligna (NMT). Los gráficos de dot-plot muestran los IRS de HO-1 obtenidos de la semicuantificación de las IHQ realizadas en las biopsias de los carcinomas mamarios y zonas adyacentes no malignas.

El tratamiento con hemina en la línea celular de carcinoma mamario LM3 alteró los niveles de varias proteínas vinculadas al cáncer

Se comenzó por analizar el grupo de proteínas cuya expresión aumentó luego del tratamiento con hemina. Utilizando el programa Perseus observamos varias proteínas involucradas en la progresión del cáncer que se encontraron aumentadas en nuestro ensayo (STAT1, STAT3, RELA, ERBB2, AKT2, MTOR, GSK3B y CDC42; Figura 6A). El interactoma generado por String en la figura 6B, muestra la relación existente entre este grupo de proteínas.

Se ha descripto que la mutación de muchos de los genes que dan origen a las proteínas estudiadas conducen a una mayor progresión tumoral, aumentando así la agresividad de la enfermedad.

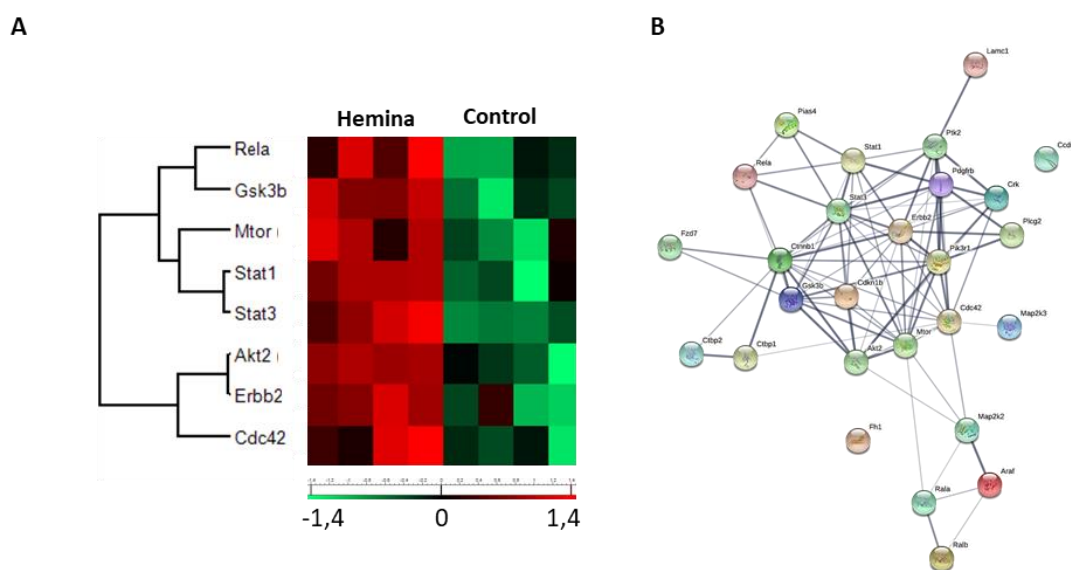


Figura 6: (A) A la izquierda se observan los niveles de expresión de proteínas vinculadas en las vías de señalización del cáncer que se encontraron aumentadas luego del tratamiento con hemina en la línea celular LM3. El color rojo indica aumento, el verde disminución de la expresión y el negro que no hay variación. Los valores de la barra indican cuantas veces aumentó o disminuyó la expresión. (B) Se muestra el interactoma de dichas proteínas.

Aumento de la expresión de proteasas involucradas en la escisión del extremo C-terminal de HO-1 luego de la modulación farmacológica con hemina en la línea celular LM3

Por otra parte, como se comentó anteriormente, existen reportes en los cuales se ha demostrado que la localización nuclear de HO-1 se correlaciona con un mayor grado de malignidad^{4,8}. Por estudios previos HO-1 aumenta su translocación al núcleo luego del tratamiento con hemina (Figura 7A) pero se desconoce la posible función que podría estar cumpliendo en este compartimiento subcelular. Se analizaron los datos obtenidos con EM con el programa Perseus y se estudiaron calpaína 1 y catepsina B, que son enzimas encargadas de cortar el extremo C-terminal de HO-1, cuya acción permite que la proteína pueda desprenderse de su localización microsomal y así migrar al núcleo. La expresión de estas

dos proteasas se encontró aumentada luego del tratamiento con hemina respecto de las células control (Figura 7B).

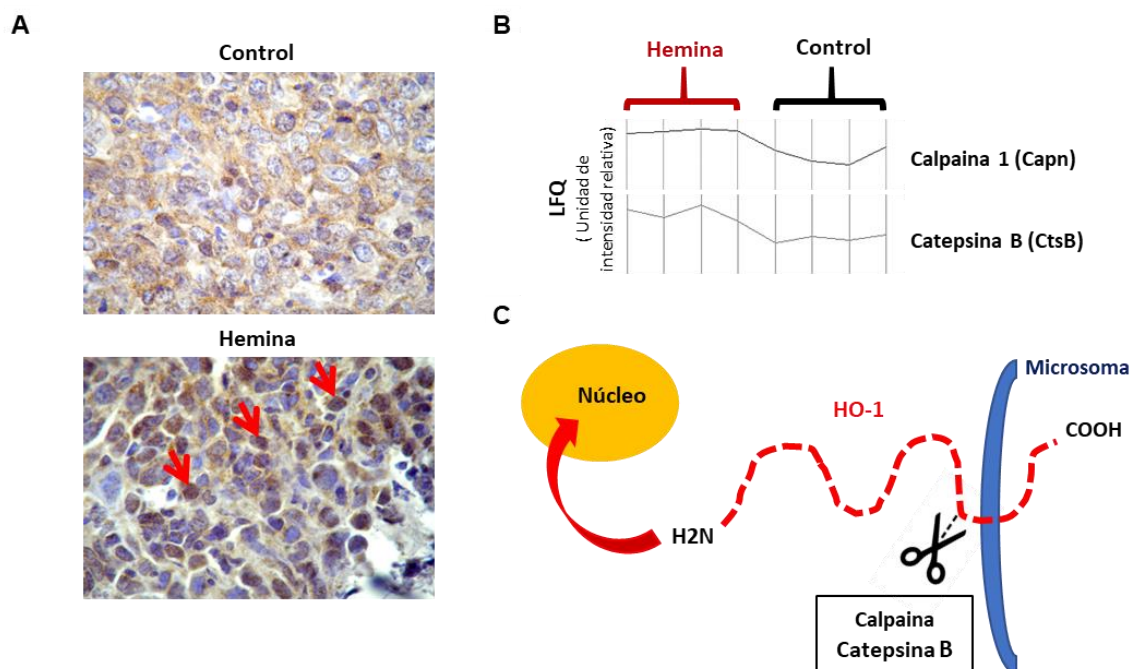


Figura 7: (A) El ensayo por inmunohistoquímica muestra la expresión de HO-1 en tumores de un modelo singéneo de células LM3 tratado con vehículo (control) o hemina. Las flechas muestran la expresión nuclear de HO-1 en la condición hemina. (B) Niveles de expresión de las proteínas involucradas en el corte del extremo C-terminal de HO-1 obtenidos por espectrometría de masas y analizado por Perseus. (C) Esquema que muestra la posible acción de calpaína y catepsina B al cortar el extremo C-terminal y su posterior translocación de HO-1 al núcleo.

La modulación farmacológica en LM3 con hemina produce cambios en los niveles de expresión en proteínas vinculadas a las adhesiones focales y del citoesqueleto

Ya se destacó que la remodelación del citoesqueleto es un aspecto clave en las células tumorales, ya que mediante este mecanismo pueden generar las estructuras necesarias para adquirir movilidad, abandonar al tumor primario y poder así migrar hacia otros órganos. Por este motivo, se analizó el grupo de proteínas del citoesqueleto cuya expresión se observó disminuida luego del tratamiento con hemina (Figura 4C). En la metástasis son de gran interés las proteínas que componen las estructuras involucradas en los mecanismos de adhesión a la matriz extracelular y migración a través de ella. Como se ha descripto anteriormente, las integrinas son los principales receptores de membrana encargados de la migración celular. El análisis de los resultados por Perseus y obtenidos por espectrometría de masas reveló que diferentes tipos de integrinas (Itg) se encontraban significativamente moduladas luego del tratamiento con hemina. Entre ellas, la integrina $\alpha V\beta 5$ que une vitronectina se encontró aumentada y las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 3$ que unen fibronectina se encontraron subexpresadas (Figura 8A). En cuanto a las talinas (Tln), proteínas de unión a las integrinas que forman parte de las adhesiones celulares, los subtipos 1 como el 2 se hallaron disminuidos luego del tratamiento con hemina. Además observamos

una disminución luego del tratamiento en otras proteínas que componen las adhesiones focales tales como las proteínas con dominio LIM (Lima1 y Limd1), Zyxin (Zyx), Filamin (Fln a,b,c) y Vimentina (Figura 8B). Sumado a las proteínas que forman las adhesiones celulares, también observamos una disminución en las proteínas que componen los filamentos de actina (Actc1) y tubulina involucrados en la migración celular (Tub a y b) (Figura 8C). Analizamos las proteínas asociadas a la estabilidad de los microtúbulos (Map), y observamos una disminución significativa de la mayoría de los miembros detectados (Figura 8D). Algunos de los resultados obtenidos por espectrometría de masas fueron confirmados por inmunofluorescencias. Se observó que el tratamiento con hemina produce disminución de las adhesiones celulares, detectadas con un anticuerpo específico para Talina 1; de las fibras de estrés de actina, detectadas con faloidina y desorganización de los filamentos de tubulina, detectados con un anticuerpo específico para beta-tubulina (Figura 8E). A su vez, mediante Western blot se observó una disminución de vimentina en las células LM3 luego del tratamiento con hemina (Figura 8F). Mediante ensayo de la herida observamos que las células tratadas con hemina tardan más en cerrar el área de la lesión que la condición control (Figura 8G).

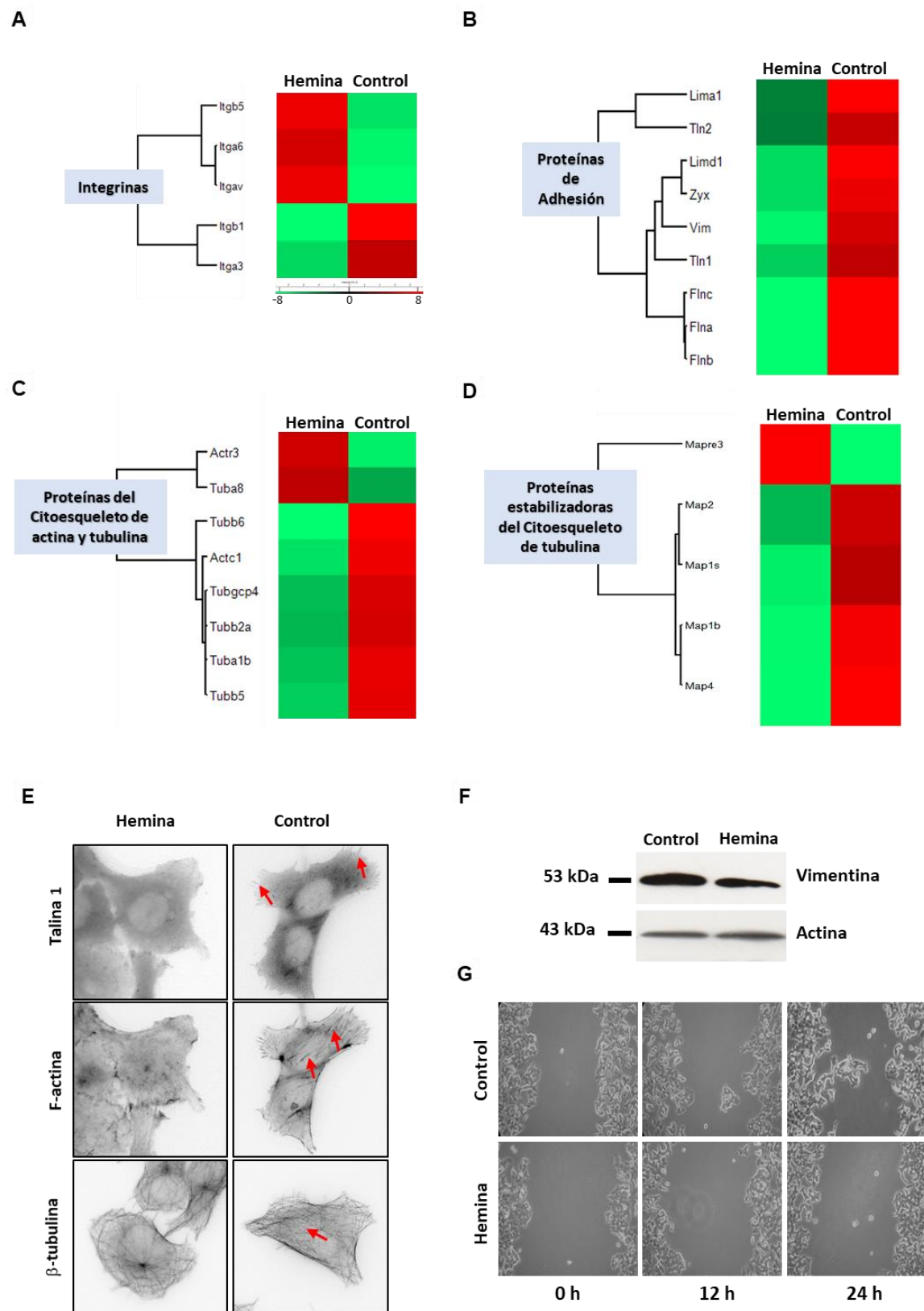


Figura 8: Niveles de expresión de proteínas de adhesiones focales y del citoesqueleto de las células LM3 luego de la modulación con hemina: El color verde indica disminución de la expresión y el rojo aumento de la expresión. Los valores de la barra indican cuantas veces aumentó o disminuyó la expresión. Proteínas de las adhesiones focales: (A) Integrinas y (B) Proteínas de Adhesión. (C) Proteínas del citoesqueleto: actina y β -tubulina-2,5 y 6. (D) Proteínas estabilizadoras del citoesqueleto de tubulina: Map 1s, 1b, 2 y 4. (E) Ensayo de inmunofluorescencia de las proteínas Talina 1, actina y β -tubulina luego del tratamiento con hemina en la línea celular LM3. (F)

Expresión de vimentina en células LM3 luego del tratamiento con hemina respecto del control. (G) Ensayo de migración de células LM3 tratadas con hemina y control. Las fotos fueron tomadas a las 0, 12 y 24 h luego del tratamiento.

Disminución de la expresión de GEF-H1 luego de la modulación farmacológica con hemina de la línea celular LM3

En base a los resultados descriptos en el apartado anterior, que muestran que el tratamiento con hemina disminuye la expresión de proteínas relacionadas con los microtúbulos y su estabilidad (Figura 8C y D) decidimos analizar qué efecto tendría la hemina sobre proteínas reguladoras de microtúbulos y de RhoA-GTPasas. Dado que se ha descripto que el activador de RhoA, GEF-H1, se encuentra unido a los microtúbulos y de esta forma los estabilizaría, decidimos analizar su expresión por EM y western blot en la línea celular LM3⁹⁸.

Mediante el análisis de los datos por Perseus, observamos una disminución de GEF-H1 cuando las células LM3 son tratadas con hemina (80 μ M) (Figura 9A). Esta disminución fue corroborada en células en cultivo mediante Western blot (Figura 9B).

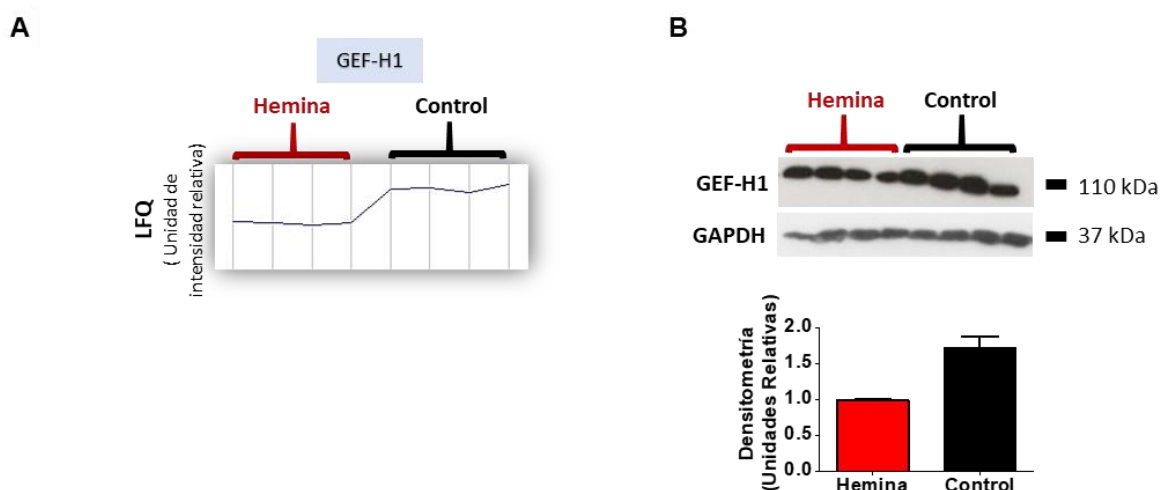


Figura 9: (A) Análisis de los niveles de expresión de GEF-H1 mediante el software Perseus de la espectrometría de masas realizada luego del tratamiento con hemina en la línea celular LM3. (B) Western blots de la expresión de la proteína GEF-H1 luego de la modulación farmacológica de la línea celular LM3 con hemina. El gráfico de barras de abajo muestra la cuantificación por densitometría de las bandas obtenidas por Western blot del tratamiento y del control ($p=0,0171$). Como control de carga se utilizó GAPDH.

Aumento de la expresión del activador de RhoA-GTPasas, GEF-H1, en biopsias humanas de carcinoma mamario

Anteriormente se comentó la importancia de las Rho-GTPasas en la remodelación del citoesqueleto de actina, cuya estructura es muy importante para que una célula pueda migrar y, mediante una desregulación en la activación en células tumorales, intervenir en el proceso de metástasis.

Recientemente se ha descrito que, GEF-H1 está involucrado en procesos tumorales, entre ellos en cáncer de mama⁷². Mediante la técnica de IHQ se procedió a estudiar los niveles de la proteína GEF-H1 en las mismas biopsias de carcinoma mamario humanas utilizadas para estudiar HO-1 para determinar su expresión en los tejidos tumorales y zonas adyacentes no malignas. Se observó sobreexpresión de GEF-H1 en las zonas tumorales con respecto al tejido adyacente no maligno (Figura 10 A). En este caso como control positivo se empleó una sección de amígdala humana. La expresión de GEF-H1 se evaluó mediante el empleo del IRS y se analizó del mismo modo que se describió para HO-1. Además, se realizaron estudios de correlación con datos histopatológicos. Se observó un aumento de la expresión de esta proteína ($p = 0,0053$; Figura 10 B), y su correlación con la presencia de metástasis (Tabla 1).

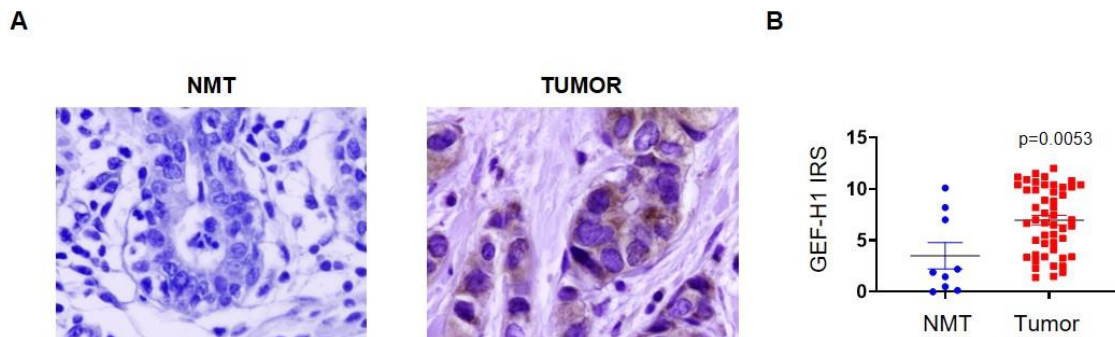


Figura 10: (A) Imágenes representativas de biopsias humanas de carcinoma mamario donde se observa la expresión de la proteína GEF-H1 por inmunohistoquímica en tejido tumoral y zonas adyacentes no malignas (NMT). (B) Gráfico de dot-plot muestra los IRS para GEF-H1 obtenidos de la semicuantificación de las IHQ realizadas en las biopsias de los carcinomas mamarios (rojo) y zonas adyacentes no malignas (azul).

Datos clínicos patológicos	N° de pacientes	GEF-H1 +	GEF-H1 -	Valor P
Tumor (cm)				
> 3	21	13	8	0,7107
< 3	28	22	6	
Edad				
≥ 50	36	22	14	0,5059
< 50	20	14	6	
Metástasis axilar				
Si	23	22	1	0,0014**
No	12	6	6	
Estado				
I	9	5	4	0,8526
IIA	4	3	1	
IIB	5	4	1	
IIIA	6	5	1	
IIIB	3	2	1	
Status				
Menarca	4	3	1	0,2118
Premenopáusica	7	3	4	
Menopáusica	5	5	0	
Postmenopáusica	22	15	7	
Grado Histológico				
G1	11	9	2	0,148
G2	18	10	8	
G3	17	14	3	
RE				
Positivo	26	18	8	0,682
Negativo	22	14	8	
PR				
Positivo	33	16	17	0,7555
Negativo	16	7	9	
Her2				
Positivo	18	12	6	0,9297
Negativo	26	17	9	

Tabla 1: Correlación de los datos clínicos histopatológicos con los niveles de expresión de GEF-H1 en biopsias humanas de carcinoma mamario. Se observa una correlación positiva significativa de GEF-H1 con el aumento de metástasis P= 0,0014.

La modulación farmacológica con hemina en la línea celular LM3 produce cambios en la expresión de proteínas vinculadas con el metabolismo del hierro

Dentro del grupo de las proteínas sobreexpresadas que se muestran en la figura 4C, las relacionadas con el metabolismo del hierro fueron las que presentaron mayor cambio. Además del rol enzimático que cumple la enzima HO-1 en la degradación del grupo hemo, el interés estuvo en encontrar una expresión

diferencial de aquellas proteínas involucradas en el aumento de los niveles de hierro libre y consecuentemente lleve a la posible producción de ROS. Utilizando el programa STRING observamos las posibles interacciones descritas para HO-1 y las proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro, como las ferritinas (Fth1 y Ftl1) (Figura 11A). Se observó que la ferritina, proteína encargada de almacenar hierro dentro de la célula, se encontraba aumentada luego del tratamiento con hemina (Figura 11B). A su vez, se observó que los niveles de expresión del receptor de transferrina 1 (RTf1), cuya función es transportar hierro al interior de la célula, se encontraban disminuidos (Figura 11 B y C). Se realizó ensayo de Western blot para evaluar la expresión del receptor de transferrina en lisados obtenidos de las células LM3 luego de modular con hemina (80 μ M) y su respectivo control tratado con vehículo. Se observó la disminución de la expresión del receptor de transferrina en las células LM3 tratadas con hemina (Figura 11D).

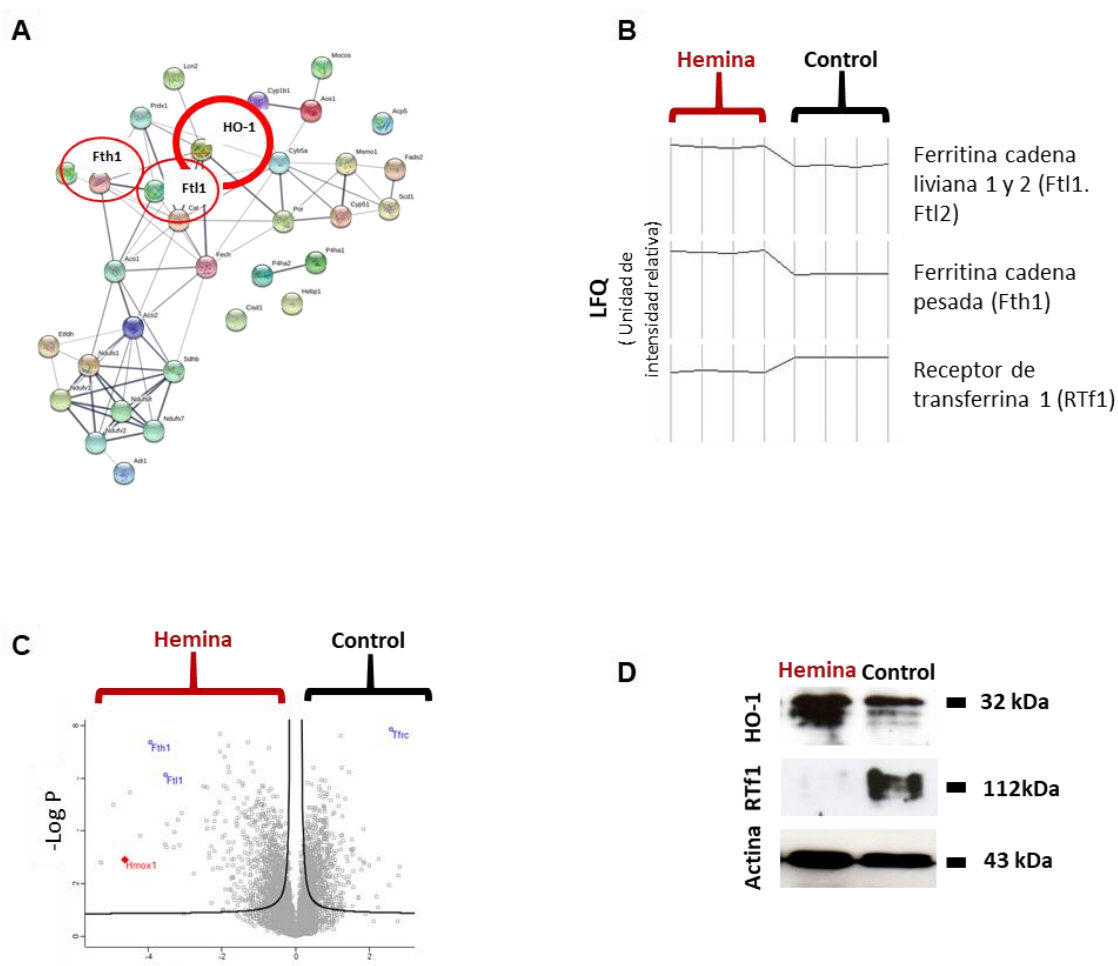


Figura 11: (A) Interactoma obtenido por String de proteínas vinculadas al metabolismo del hierro luego del tratamiento con hemina. (B) Análisis de la expresión por el software Perseus de los niveles de tres proteínas involucradas en el metabolismo del hierro obtenidas por espectrometría de masas luego de la modulación con hemina en la línea celular LM3. (C) El gráfico tipo volcán muestra los niveles de sobreexpresión y subexpresión de las proteínas vinculadas al metabolismo del hierro en las células LM3 luego del tratamiento con hemina y

vehículo. (D) El ensayo de Western blot muestra la expresión de HO-1 y el receptor de transferrina (RTf1) luego del tratamiento con hemina. La actina fue utilizada como control de carga.

La modulación farmacológica con hemina en la línea celular LM3 produce cambios en los niveles de expresión de proteínas vinculadas al metabolismo lipídico y movilización de lípidos

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que, al tratar las células con hemina, aumenta la muerte celular por apoptosis en la línea celular LM3; sin embargo, los mecanismos por los cuales se induce este tipo de muerte celular todavía no son muy conocidos. Cada vez se centra más la atención en el papel de los hidroperóxidos lipídicos, cuya acumulación dentro de la célula podría estar dañando la membrana celular llevando a una muerte celular por ferroptosis. El análisis de espectrometría reveló que dentro de las proteínas cuyos niveles de expresión aumentaron luego del tratamiento con hemina, se encontraban las proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos (Figura 4C). El análisis de este grupo de proteínas por medio de Perseus reveló un aumento en la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos de membrana. Estas enzimas son: perilipina-3, acetil-CoA acetiltransferasa, y fosfatidilinositol 3-quinasa (Figura 12A). Cabe destacar que la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa forma parte de rutas metabólicas que se encuentran desreguladas en cáncer.

Para indagar si el aumento de la expresión de estas proteínas producto del tratamiento con hemina tenía efecto sobre el perfil de lípidos de las células, se obtuvieron extractos lipídicos de la línea celular LM3 luego de tratarlas con hemina 80 μ M y se realizó una cromatografía en capa fina. Notoriamente, se observó un aumento de lípidos neutros, principalmente ésteres de colesterol (EC) y triacilglicéridos (TAG), a la vez que se observó un aumento moderado de un lípido con un *rf* similar al fosfatidilinositol (Figura 12B).

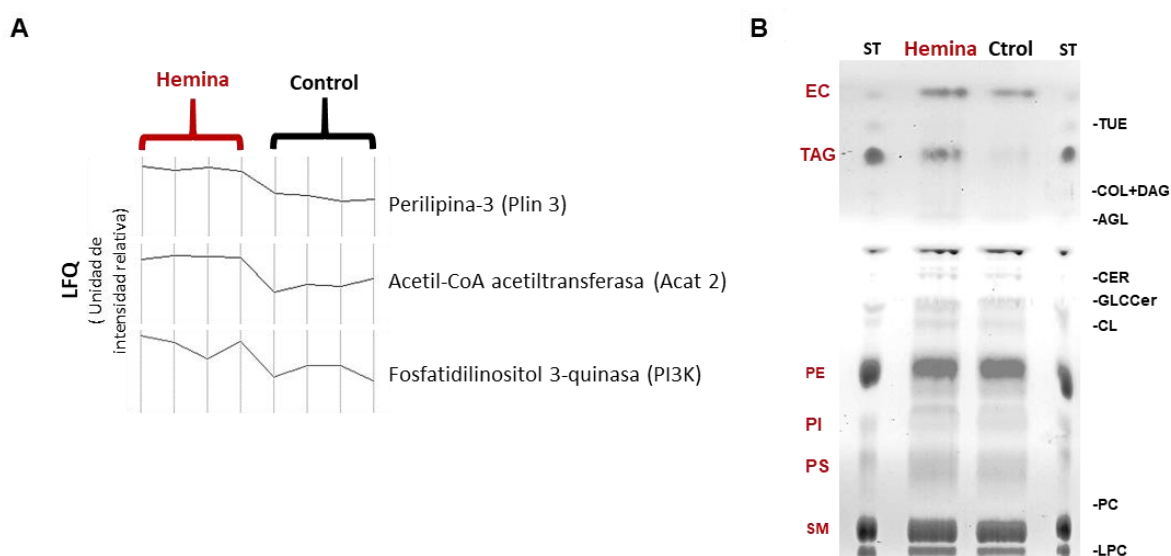


Figura 12: (A) Estudio de los niveles de expresión de las enzimas Plin3, Acat2 y PI3K luego del tratamiento con hemina mediante Perseus de la espectrometría de masas realizada a partir de los lisados de la línea LM3. (B) Estudio por cromatografía en capa fina mostrando los niveles de expresión de distintas moléculas lipídicas luego del tratamiento con hemina. EC: ésteres de colesterol, TAG: triacilglicéridos, PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol, PS: fosfatidilserina, SM: esfingomielina.

DISCUSIÓN

A partir del análisis de la espectrometría de masas (EM) observamos que el modulador farmacológico hemina estimula la expresión de muchas proteínas y disminuye la de muchas otras, en la línea celular de carcinoma mamario murino LM3. Dentro de las 353 proteínas sobreexpresadas en relación a la condición control, observamos que la enzima HO-1 fue una de las muchas que se encontraron moduladas positivamente por el accionar farmacológico de la hemina, como era de esperar debido a los efectos previamente reportados para la misma. También se encontraron aumentadas proteínas relacionadas al metabolismo lipídico y del hierro. Dentro de las 595 cuya expresión se vio disminuida, observamos un grupo de proteínas vinculadas al citoesqueleto y otro grupo involucradas en la biogénesis ribosomal.

Como hemos comentado previamente, existe en la literatura evidencia de que los moduladores farmacológicos empleados para inducir la expresión y actividad de HO-1 pueden ejercer la expresión de otras proteínas de manera independiente a la acción de esta enzima⁹⁷. Teniendo esto presente, los resultados serán discutidos en función de la acción farmacológica de la hemina y no al accionar directo de HO-1.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la enzima HO-1 influye en la supervivencia de las células tumorales, la apoptosis, la invasión y la metástasis. Además, dependiendo del tipo de tumor estudiado, la proteína puede tener un rol promotor o inhibidor de la progresión tumoral^{4-6,40,41}. Esto sugiere alteraciones en la transducción de señales y en las vías de transcripción, que HO-1 afecta directa o indirectamente. Para identificar estos mecanismos reguladores y determinar la identidad de los genes, cuya expresión se ve afectada luego de la modulación farmacológica con hemina, realizamos un estudio del interactoma de HO-1 empleando para ello la línea celular LM3 proveniente de un adenocarcinoma de mama.

Se confirmó por medio de EM y Western blot que HO-1 se encuentra sobreexpresada en las células LM3 luego de la modulación con hemina. También hemos estudiado la expresión de HO-1 en un modelo murino singeneico de la línea celular LM3 al cual se lo había tratado con hemina. Observamos por inmunohistoquímica que la expresión de HO-1 se encuentra sobreexpresada en los tumores tratados con esta protoforfirina y que se observa además expresión nuclear de la enzima. Este resultado también es concordante con lo observado en las biopsias humanas. Además, se ha reportado que la migración de HO-1 al núcleo requiere la escisión de una porción de la proteína en el extremo carboxilo terminal lo que permite que se libere de las membranas en las que se encuentra anclada. En los diversos ensayos de Western blot realizados para detectar HO-1, utilizando el mismo anticuerpo SPA-896 empleado por Lin y colaboradores, no fue posible detectar con absoluta claridad la presencia de las dos bandas cuando se empleó extracto total de la línea celular LM3. Sin embargo y tal como se comentó más arriba, sí fue posible detectar la presencia de la proteína en el modelo singeneico de LM3 luego del tratamiento con hemina y en las biopsias humanas. Además, en los estudios realizados por EM observamos que las dos

proteasas que cortan el extremo C-terminal de HO-1, cathepsina y calpaína, se encuentran sobreexpresadas luego de la modulación farmacológica. Se ha sugerido que HO-1 nuclear podría intervenir en la estimulación de la expresión de genes relacionados con la protección contra el estrés oxidativo³⁹. Hay también evidencia que demuestra que HO-1 podría tener un rol fisiológico independiente de su actividad enzimática. Así es que nuestro laboratorio ha reportado que la presencia de HO-1 nuclear carece de actividad enzimática, luego de medir los productos de la degradación del grupo hemo posterior a la estimulación con hemina de cultivos de la línea celular LM3⁶. Otra evidencia fue reportada por Hori y colaboradores, quienes observaron que la transfección con un mutante de HO-1 carente de actividad enzimática protege contra el estrés oxidativo⁹⁹. Sin embargo, dado que en la estructura de la proteína no se han observado sitios de unión a ADN, esta enzima no actuaría como un factor de transcripción típico, sino que podría actuar como un co-regulador transcripcional³⁹. Como los estudios realizados hasta el momento por EM fueron realizados empleando extracto proteico total de las células, no pudimos estudiar el posible rol de HO-1 en el núcleo celular. El estudio del interactoma de HO-1 en el núcleo celular durante la próxima etapa, de formación doctoral, nos permitirá saber con mayor precisión el rol que cumple esta proteína en este compartimiento subcelular con el fin de entender el rol nuclear de la proteína.

Dentro del grupo de proteínas que se encontraron fuertemente moduladas se destacaron las proteínas vinculadas al citoesqueleto. Existen reportes de otros laboratorios y del nuestro que relacionan el aumento de HO-1 en carcinoma mamario con la disminución de la metástasis. Para poder migrar e invadir a través de la MEC, las células hacen uso de su citoesqueleto. Luego del tratamiento con hemina ciertas integrinas se encuentran aumentadas y otras disminuidas, las proteínas pertenecientes a las adhesiones focales se encontraron disminuidas como así también los filamentos de actina y tubulina y sus proteínas estabilizadoras. Esto indica que la maquinaria responsable de permitir la migración celular se encuentra alterada, lo que se corrobora en el ensayo de la herida, donde las células LM3 tratadas con hemina migran menos presentando, por lo tanto, un fenotipo menos agresivo^{100,101}.

Como han descrito anteriormente Ridley y colaboradores, la familia de Rho-GTPasas son las principales proteínas encargadas de la regulación del citoesqueleto¹⁰². Asimismo, hemos reportado previamente que las integrinas están involucradas en la activación de ciertas RhoGTPasas¹⁰³. Los resultados preliminares de la Dra. Coló, demuestran que las integrinas de unión a fibronectinas se encuentran involucradas en la activación de GEF-H1, descripto como activador de RhoA y estabilizador de microtúbulos¹⁰⁴.

Observamos en este trabajo que la proteína GEF-H1 disminuye luego del tratamiento con hemina en las células de carcinoma mamario murino LM3. Esto podría explicar la inestabilidad de los microtúbulos observada en nuestro modelo luego del tratamiento con hemina. Estos resultados llevarían a una probable disminución de la activación de RhoA-GTPasas encargadas de regular la dinámica del citoesqueleto de actina y tubulina. De esta manera, se encontraría afectada la correcta formación de las adhesiones focales disminuyendo la migración celular.

El ensamblado correcto de las adhesiones focales y la mecanoseñalización desde el exterior al interior celular a través de las integrinas y citoesqueleto de actina, es un proceso fundamental para la adhesión, migración y señalización celular. Estos procesos se encuentran estrechamente ligados a la metástasis de células tumorales. Ha sido descrito previamente el rol de la activación de GTPasas en distintos tipos de tumores^{105,106}, por esta razón, estudiamos la expresión de uno de los activadores de RhoA, GEF-H1, en biopsias humanas.

Hemos observado un aumento de la expresión de GEF-H1 en tejido tumoral de biopsias de carcinoma mamario con respecto al tejido no tumoral correlacionado significativamente con un aumento en las metástasis, sugiriendo así un rol prometastático de GEF-H1 y un rol antitumoral a la hemina al generar disminución de su expresión. Si bien los resultados obtenidos en este trabajo de tesis no muestran aún una correlación entre la expresión de HO-1 y GEF-H1 en las biopsias humanas, podría deberse al bajo número de muestras hasta ahora estudiadas para ambas proteínas. Esto se ve reforzado por lo observado en los análisis obtenidos del estudio de EM y de Western blot luego de modular con hemina, donde se observa que cuando se estimula con hemina se produce un aumento de la expresión de HO-1 y disminución de la expresión de GEF-H1.

De las 353 proteínas sobreexpresadas observamos dos subgrupos que interaccionaban con HO-1, uno de ellos relacionadas al metabolismo lipídico y un segundo al del hierro. Los resultados obtenidos mediante el programa Perseus en relación al grupo de proteínas involucradas en el metabolismo lipídico que se encontraron aumentadas con hemina, sumados a los resultados obtenidos en la cromatografía, nos llevaría a concluir que el aumento de EC y TAG podría estar indicando un incremento en el número o en el tamaño en las organelas que almacenan estos lípidos neutros, es decir, las gotas lipídicas citoplasmáticas. Este resultado, correlaciona fuertemente con el aumento de expresión de la proteína Plin3, dado que ésta juega un rol crucial en la estabilización y formación de las gotas lipídicas intracelulares¹⁰⁷. A su vez, el aumento de EC observado podría estar relacionado con el aumento de la expresión de Acat-2, encargada de acilar un ácido graso en la molécula de colesterol.

En relación al metabolismo del hierro, nuestros primeros ensayos nos permitirían concluir que existen proteínas vinculadas a la movilización del hierro que aumentan con el tratamiento con hemina. En un principio se describió que HO-1 convierte el hemo en biliverdina, monóxido de carbono y produce liberación de hierro libre en el citoplasma¹⁰⁸. Por lo tanto, el hierro está claramente relacionado con la actividad enzimática de HO-1. En nuestros ensayos para esta tesis de grado observamos que tanto las cadenas livianas como las pesadas de ferritina, se encuentran sobreexpresadas luego de la modulación con hemina. Bauckman y colaboradores informaron que el exceso de hierro produce muerte celular en el cáncer de ovario por estrés oxidativo⁷⁴. Además, la ligera expresión de ferritina en células tumorales con HO-1 activada o sobreexpresada en modelos animales y biopsias humanas podría producir un bajo crecimiento celular, dado que Alkhateeb y Connor demostraron que la ferritina induce un aumento del crecimiento celular independientemente de los niveles de hierro en las células de cáncer de mama¹⁰⁹. En este sentido, Yang y colaboradores, han demostrado que la baja regulación de la ferritina en las células

de carcinoma de mama humano MCF-7 resultó en la inhibición del crecimiento celular a través del aumento de la apoptosis¹¹⁰.

El exceso de hierro puede generar estrés oxidativo a partir de la producción de ROS. Observamos por análisis de EM que luego del tratamiento con hemina aumentan las proteínas encargadas de almacenar hierro dentro de las células llevando a un aumento de los niveles de hierro intracelular. Sin embargo, tal como observamos por Western blot, la disminución del receptor de transferrina evitaría que siga acumulándose hierro dentro de las células. Es probable que el exceso de hierro que no puede ingresar y almacenarse dentro de las células esté actuando como factor estresante desencadenando la producción de ROS.

Así mismo, dentro de las ROS, los hidroperóxidos lipídicos podrían llevar a la muerte celular por ferroptosis al generar la ruptura de las membranas celulares. El aumento de proteínas encargadas de desprender los lípidos de membrana acompañado del aumento de lípidos libres dentro de las células tratadas con hemina, nos lleva a la conclusión de que este podría ser el mecanismo por el cual, luego del tratamiento con hemina, aumentan los niveles de apoptosis en las células⁶.

En resumen, hemos determinado que la hemina genera una disminución de las proteínas relacionada con el citoesqueleto y la migración celular e induce un aumento de las proteínas del hierro y lipídicas. Estos resultados estarían estrechamente vinculados a dos proteínas analizadas particularmente en este trabajo de tesis, como es la enzima HO-1 y el activador de RhoAGTPasas GEF-H1, ambas involucradas en el desarrollo del cáncer y la metástasis. Nos parece importante resaltar que este trabajo de tesis estaría contribuyendo al conocimiento de otras proteínas que se encuentran reguladas por la modulación con hemina. No se nos escapa el carácter preliminar de los resultados obtenidos en esta tesis en la posible interacción que HO-1 tendría con las diferentes vías y proteínas estudiadas. En este trabajo, hemos utilizado a la hemina como fármaco descripto para la activación de HO-1, y poder estudiar su posible rol en diferentes procesos biológicos. En relación a esto es importante puntualizar que se ha reportado que uno de los moduladores farmacológicos de HO-1, el compuesto Zn protoporfirina IX tiene efectos biológicos independientes de la acción de la enzima¹¹¹. Por ejemplo, en dicho trabajo, se demostró que la proliferación de células fue inhibida por esta molécula, aunque el estaño protoporfirina IX, otro potente inhibidor de HO-1 no tuvo ningún efecto. Esta publicación llama la atención sobre la posibilidad que los efectos observados al modular farmacológicamente a la proteína, sean producidos por el propio modulador y no por la activación o inhibición de la enzima. Para descartar esta posibilidad la modulación farmacológica debe ser complementada con experimentos de modulación genética de la enzima, tales como por ejemplo su inhibición utilizando siRNA o incrementando su expresión con los diversos métodos disponibles. Esto será realizado durante una futura etapa de formación doctoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pando-Robles, V. & Ferreira-Batista, C. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Una Vent. al quehacer científico* (2007).
2. Hanash, S. M., Pitteri, S. J. & Faca, V. M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature* (2008). doi:10.1038/nature06916
3. Jaworski, F. M. *et al.* In vivo hemin conditioning targets the vascular and immunologic compartments and restrains prostate tumor development. *Clin. Cancer Res.* (2017). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0112
4. Gandini, N. A. *et al.* Nuclear localization of heme oxygenase-1 is associated with tumor progression of head and neck squamous cell carcinomas. *Exp. Mol. Pathol.* (2012). doi:10.1016/j.yexmp.2012.05.001
5. Gandini, N. A. *et al.* Heme oxygenase-1 expression in human gliomas and its correlation with poor prognosis in patients with astrocytoma. *Tumor Biol.* (2014). doi:10.1007/s13277-013-1373-z
6. Gandini, N. A. *et al.* Heme Oxygenase-1 Has an Antitumor Role in Breast Cancer. *Antioxid. Redox Signal.* **30**, ars.2018.7554 (2019).
7. Gueron, G. *et al.* Critical Role of Endogenous Heme Oxygenase 1 as a Tuner of the Invasive Potential of Prostate Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* (2009). doi:10.1158/1541-7786.mcr-08-0325
8. Sacca, P. *et al.* Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *Br. J. Cancer* (2007). doi:10.1038/sj.bjc.6604081
9. Tenhunen, R., Marver, H. S. & Schmid, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* (1969).
10. Tenhunen, R., S, M. H. & R, S. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1968).
11. Maines, M. D., Anders, M. W. & Muller Eberhard, U. Studies on heme transfer from microsomal hemoproteins to heme binding plasma proteins. *Mol. Pharmacol.* (1974).
12. Maines, M. D. & Gibbs, P. E. M. 30 some years of heme oxygenase: From a “molecular wrecking ball” to a “mesmerizing” trigger of cellular events. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 568-577 (2005).
13. Jozkowicz, A., Was, H. & Dulak, J. Heme Oxygenase-1 in Tumors: Is It a False Friend? *Antioxid. Redox Signal.* (2007). doi:10.1089/ars.2007.1659

14. Was, H., Dulak, J. & Jozkowicz, A. Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy. *Curr. Drug Targets* (2012). doi:10.2174/1389450111009011551
15. Maines, M. D., Trakshel, G. M. & Kutty, R. K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* (1986).
16. Maines, M. D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* **2**, 2557-2568 (1988).
17. Cruse, I. & Maines, M. D. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J. Biol. Chem.* (1988).
18. McCoubrey, W. K. & Maines, M. D. The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene* (1994). doi:10.1016/0378-1119(94)90749-8
19. Mccoubrey, W. K., Huang, T. J. & Maines, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* (1997). doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00725.x
20. Hayashi, S. *et al.* Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* (2004). doi:10.1016/j.gene.2004.04.002
21. Alam, J., Shibahara, S. & Smith, A. Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* (1989).
22. Lavrovsky, Y., Schwartzman, M. L., Levere, R. D., Kappas, A. & Abraham, N. G. Identification of binding sites for transcription factors NF- κ B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1994). doi:10.1073/pnas.91.13.5987
23. Foresti, R., Clark, J. E., Green, C. J. & Motterlini, R. Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase- 1 induction in endothelial cells: Involvement of superoxide and peroxynitrite anions. *J. Biol. Chem.* (1997). doi:10.1074/jbc.272.29.18411
24. Callahan, K. S. Effect of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 α on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* (1998). doi:10.1152/ajpheart.1998.274.3.h883
25. Motterlini, R. *et al.* Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* (2000). doi:10.1074/jbc.275.18.13613
26. Stuhlmeier, K. M. Activation and regulation of Hsp32 and Hsp70. *Eur. J. Biochem.* (2000). doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01112.x

27. Zhang, W. L., Tsuneishi, S. & Nakamura, H. Induction of heat shock proteins and its effects on glial differentiation in rat C6 glioblastoma cells. *Kobe J. Med. Sci.* (2001).
28. Shibahara, S., Nakayama, M., Kitamuro, T., Udono-Fujimori, R. & Takahashi, K. Repression of heme oxygenase-1 expression as a defense strategy in humans. en *Experimental Biology and Medicine* (2003). doi:10.1177/15353702-0322805-08
29. Maines, M. D. & Abrahamsson, P. A. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: Normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* (1996). doi:10.1016/S0090-4295(96)00010-6
30. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
31. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
32. Burdick, A. D. *et al.* Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res.* **63**, 7825-33 (2003).
33. Brown, N. S. & Bicknell, R. Oxidative stress: Its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Research* (2001). doi:10.1186/bcr315
34. Policastro, L. *et al.* Imbalance of Antioxidant Enzymes in Tumor Cells and Inhibition of Proliferation and Malignant Features by Scavenging Hydrogen Peroxide. *Mol. Carcinog.* (2004). doi:10.1002/mc.20001
35. Kampa, M. *et al.* Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.* (2004). doi:10.1186/bcr752
36. Kim, D. H. *et al.* 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 upregulates the expression of heme oxygenase-1 and subsequently matrix metalloproteinase-1 in human breast cancer cells: Possible roles of iron and ROS. *Carcinogenesis* (2009). doi:10.1093/carcin/bgp012
37. Lin, C.-W., Shen, S.-C., Hou, W.-C., Yang, L.-Y. & Chen, Y.-C. Heme oxygenase-1 inhibits breast cancer invasion via suppressing the expression of matrix metalloproteinase-9. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1195-1206 (2008).
38. Leonardi, D. B. *et al.* Heme oxygenase 1 impairs glucocorticoid receptor activity in prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* (2019). doi:10.3390/ijms20051006
39. Lin, Q. *et al.* Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J. Biol. Chem.* (2007). doi:10.1074/jbc.M607954200
40. Degese, M. S. *et al.* Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC)

- and its correlation with clinical data. *Lung Cancer* (2012). doi:10.1016/j.lungcan.2012.02.016
41. Andrés, N. C. *et al.* Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: Involvement of p53. *Exp. Mol. Pathol.* (2014). doi:10.1016/j.yexmp.2014.09.012
 42. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687 (2002).
 43. Hirata, H., Tatsumi, H., Lim, C. T. & Sokabe, M. Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: a crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **306**, C607-20 (2014).
 44. Schiller, H. B. *et al.* β 1- and α v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat. Cell Biol.* **15**, 625-636 (2013).
 45. Plotnikov, S. V., Pasapera, A. M., Sabass, B. & Waterman, C. M. Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell* **151**, 1513-1527 (2012).
 46. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35 (2002).
 47. Sahai, E. & Marshall, C. J. Rho-Gtpases and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 133-142 (2002).
 48. Martín, M. J. *et al.* The G α 12/13 family of heterotrimeric G proteins and the small GTPase RhoA link the Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor to heme oxygenase-1 expression and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* (2007). doi:10.1074/jbc.M703043200
 49. Fan, L., Pellegrin, S., Scott, A. & Mellor, H. The small GTPase Rif is an alternative trigger for the formation of actin stress fibers in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **123**, 1247-1252 (2010).
 50. Danuser, G. & Waterman-Storer, C. M. Quantitative fluorescent speckle microscopy of cytoskeleton dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* (2006). doi:10.1146/annurev.biophys.35.040405.102114
 51. Schiller, H. B., Friedel, C. C., Boulegue, C. & Fässler, R. Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep.* **12**, 259-266 (2011).
 52. Jiu, Y. *et al.* Vimentin intermediate filaments control actin stress fiber assembly through GEF-H1 and RhoA. *J. Cell Sci.* **130**, 892-902 (2017).
 53. Vega, F. M. & Ridley, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* **582**, 2093-2101 (2008).
 54. Goicoechea, S. M., Awadia, S. & Garcia-Mata, R. I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adhes. Migr.* **8**, 535-549 (2014).
 55. Hodge, R. G. & Ridley, A. J. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell*

- Biol.* **17**, 496-510 (2016).
56. Ponimaskin, E., Voyno-Yasenetskaya, T., Richter, D. W., Schachner, M. & Dityatev, A. Morphogenic Signaling in Neurons Via Neurotransmitter Receptors and Small GTPases. *Mol. Neurobiol.* **35**, 278-287 (2007).
 57. Cheng, I. K. C. *et al.* GEF-H1 over-expression in hepatocellular carcinoma promotes cell motility via activation of RhoA signalling. *J. Pathol.* **228**, 575-585 (2012).
 58. Cullis, J. *et al.* The RhoGEF GEF-H1 Is Required for Oncogenic RAS Signaling via KSR-1. *Cancer Cell* **25**, 181-195 (2014).
 59. Tao, K. Guanine nucleotide exchange factor H1 can be a new biomarker of melanoma. 89-98 (2016).
 60. Colo, G. P. *et al.* Focal adhesion disassembly is regulated by a RIAM to MEK-1 pathway. *J Cell Sci* **125**, 5338-5352 (2012).
 61. Hernández-Varas, P. *et al.* Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) protein controls invasion and growth of melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 18492-504 (2011).
 62. Coló, G. P., Lafuente, E. M. & Teixidó, J. The MRL proteins: Adapting cell adhesion, migration and growth. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 861-868 (2012).
 63. Hermann, M.-R. *et al.* Integrins synergise to induce expression of the MRTF-A-SRF target gene ISG15 for promoting cancer cell invasion. *J. Cell Sci.* **129**, 1391-403 (2016).
 64. Schroeder, A. *et al.* Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer* (2012). doi:10.1038/nrc3180
 65. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* **147**, 275-292 (2011).
 66. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* (1998). doi:10.1126/science.279.5350.509
 67. Gueron, G. *et al.* Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget* (2015). doi:10.18632/oncotarget.1826
 68. Paez, A. V. *et al.* Heme oxygenase-1 in the forefront of a multi-molecular network that governs cell-cell contacts and filopodia-induced zippering in prostate cancer. *Cell Death Dis.* (2016). doi:10.1038/cddis.2016.420
 69. Meiri, D. *et al.* Mechanistic insight into the microtubule and actin cytoskeleton coupling through dynein-dependent RhoGEF inhibition. *Mol. Cell* **45**, 642-55 (2012).
 70. Cheng, I. K. C. *et al.* GEF-H1 over-expression in hepatocellular carcinoma promotes cell

- motility via activation of RhoA signalling. *J. Pathol.* **228**, 575-585 (2012).
71. Sandi, M. J. *et al.* MARK3-mediated phosphorylation of ARHGEF2 couples microtubules to the actin cytoskeleton to establish cell polarity. *Sci. Signal.* **10**, 1-22 (2017).
 72. Liao, Y. C. *et al.* Overexpressed hPTTG1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by regulating GEF-H1/RhoA signalling. *Oncogene* **31**, 3086-3097 (2012).
 73. Zhang, S. *et al.* Disordered hepcidin-ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cell. Signal.* (2014). doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.029
 74. Bauckman, K. *et al.* Iron alters cell survival in a mitochondria-dependent pathway in ovarian cancer cells. *Biochem. J.* (2015). doi:10.1042/BJ20140878
 75. Ganz, T. & Nemeth, E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 1434-1443 (2012).
 76. Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Hentze, M. W. Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (IRE/IRP) Regulatory Network. *Annu. Rev. Nutr.* (2008). doi:10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521
 77. Jiang, X. P., Elliott, R. L. & Head, J. F. Manipulation of iron transporter genes results in the suppression of human and mouse mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res.* (2010).
 78. Jenkitkasemwong, S., Wang, C.-Y., Mackenzie, B. & Knutson, M. D. Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *BioMetals* **25**, 643-655 (2012).
 79. Ganz, T. & Nemeth, E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (2006). doi:10.1016/j.bbamcr.2006.03.014
 80. Emerit, J., Beaumont, C. & Trivin, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed. Pharmacother.* **55**, 333-339 (2001).
 81. Wang, C. *et al.* BMP-6 inhibits MMP-9 expression by regulating heme oxygenase-1 in MCF-7 breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2011). doi:10.1007/s00432-010-0963-z
 82. Pinnix, Z. K. *et al.* Ferroportin and Iron Regulation in Breast Cancer Progression and Prognosis. *Sci. Transl. Med.* **2**, 43ra56-43ra56 (2010).
 83. Gaschler, M. M. & Stockwell, B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2017). doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086
 84. Turini, M. E. & DuBois, R. N. Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. *Annu. Rev. Med.* (2002). doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103952
 85. Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D. & Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for

- leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (2015). doi:10.1016/j.bbalip.2014.08.012
86. Ackermann, J. A., Hofheinz, K., Zaiss, M. M. & Krönke, G. The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (2017). doi:10.1016/j.bbalip.2016.07.014
 87. Friedmann Angeli, J. P. *et al.* Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell Biol.* **16**, 1180-1191 (2014).
 88. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* (2012). doi:10.1016/j.cell.2012.03.042
 89. Tabner, B. J., Turnbull, S., El-Agnaf, O. & Allsop, D. Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 507-17 (2001).
 90. Basu-Modak, S., Lüscher, P. & Tyrrell, R. M. Lipid metabolite involvement in the activation of the human heme oxygenase-1 gene. *Free Radic. Biol. Med.* (1996). doi:10.1016/0891-5849(95)02182-5
 91. Abdelbaset-Ismail, A. *et al.* Bioactive Phospholipids Enhance Migration and Adhesion of Human Leukemic Cells by Inhibiting Heme Oxygenase 1 (HO-1) and Inducible Nitric Oxygenase Synthase (iNOS) in a p38 MAPK-Dependent Manner. *Stem Cell Reviews and Reports* (2019). doi:10.1007/s12015-018-9853-6
 92. Muppala, V., Lin, C. S. & Lee, Y. H. The role of HNF-1 α in controlling hepatic catalase activity. *Mol. Pharmacol.* (2000).
 93. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976). doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
 94. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
 95. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
 96. Turner, J. D. & Rouser, G. Precise quantitative determination of human blood lipids by thin-layer and triethylaminoethylcellulose column chromatography. II. Plasma lipids. *Anal. Biochem.* (1970). doi:10.1016/0003-2697(70)90468-9
 97. Lim, E. J. *et al.* Hemin inhibits cyclin D1 and IGF-1 expression via STAT5b under hypoxia in ER α -negative MDA-MB 231 breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* (2010). doi:10.3892/ijo-

98. Birkenfeld, J., Nalbant, P., Yoon, S. H. & Bokoch, G. M. Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends in Cell Biology* (2008). doi:10.1016/j.tcb.2008.02.006
99. Hori, R. *et al.* Gene transfection of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M107749200
100. Hamidi, H. & Ivaska, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* (2018). doi:10.1038/s41568-018-0038-z
101. Maziveyi, M. & Alahari, S. K. Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.17265
102. Ridley, A. J. Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* (2001).
103. Bharadwaj, M. *et al.* α V-class integrins exert dual roles on α 5 β 1 integrins to strengthen adhesion to fibronectin. *Nat. Commun.* **8**, 14348 (2017).
104. Heck, J. N. *et al.* Microtubules regulate GEF-H1 in response to extracellular matrix stiffness. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2583-2592 (2012).
105. Cullis, J. *et al.* The RhoGEF GEF-H1 Is Required for Oncogenic RAS Signaling via KSR-1. *Cancer Cell* (2014). doi:10.1016/j.ccr.2014.01.025
106. Tao Kai *et al.* Guanine nucleotide exchange factor H1 can be a new biomarker of melanoma. *Biol. Targets Ther.* **Volume 10**, 89-98 (2016).
107. Nose, F. *et al.* Crucial Role of Perilipin-3 (TIP47) in Formation of Lipid Droplets and PGE2 Production in HL-60-Derived Neutrophils. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0071542
108. Khan, A. A. & Quigley, J. G. Control of intracellular heme levels: Heme transporters and heme oxygenases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (2011). doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.008
109. Alkhateeb, A. A. & Connor, J. R. The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1836**, 245-254 (2013).
110. Yang, D. C., Jiang, X., Elliott, R. L. & Head, J. F. Antisense ferritin oligonucleotides inhibit growth and induce apoptosis in human breast carcinoma cells. *Anticancer Res.* (2002).
111. La, P. *et al.* Zinc protoporphyrin regulates cyclin D1 expression independent of heme oxygenase inhibition. *J. Biol. Chem.* (2009). doi:10.1074/jbc.M109.031641

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PREMIOS

Los resultados obtenidos en esta tesis de grado han permitido la presentación de trabajos en congresos y la premiación de dos de ellos en la Reunión Anual de Sociedades de Biociencia por SAIC.

Presentación de pósters

Fecha: 13/11/2019 al 16/11/2019

Nombre del evento: Reunión Anual de Sociedades de Biociencia

Lugar: Mar del Plata

Título del trabajo: Proteomic study of breast cancer cell line after hemoxygenase-1 modulation by hemin treatment

Autores: **Schweitzer K.**, Fernández Chávez L., Alonso E.G., Mascaró M., Oresti G.M., Borisov A., Facchinetti M.M., Curino A.C., Fässler R., Coló G.P., Gandini N.A.

Fecha: 31/10/2019 al 01/11/2019

Nombre del evento: XXXIV Jornadas Multidisciplinarias del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

Lugar: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Título del trabajo: Rol del activador de RhoA-GTPasas, GEF-H1, en cáncer

Autores: **Schweitzer K.**, Fernández Chávez L., Barrera-Lamas N., Gandini N.A., Alonso E.G., Mascaró M., Pichel P., Recio S., Fässler R., Facchinetti M.M., Curino A., Coló G.P.

Premios y/o distinciones

Fecha: 16/11/2019

Institución otorgante: Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)

Tipo de premio o distinción: Premio Lucio Cherny

Título del trabajo: Integrin-mechanotransduction role in small GTPases activation and cancer

Autores: Coló, G.P., Fernández Chávez L., **Schweitzer K.**, Barrera-Lamas N., Gandini N.A., Alonso E.G., Mascaró M., Pichel P., Recio S., Fässler R., Facchinetti, M.M. and Curino, A.

Fecha: 16/11/2019

Institución otorgante: Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)

Tipo de premio o distinción: Distinción al póster

Título del trabajo: Proteomic study of breast cancer cell line after hemoxygenase-1 modulation by hemin treatment

Autores: **Schweitzer K.**, Fernández Chávez L., Alonso E.G., Mascaró M., Oresti G.M., Borisov A., Facchinetti M.M., Curino A.C., Fässler R., Coló G.P., Gandini N.A.