

Evaluación *in vitro* de la actividad proteolítica de Células de Carcinoma Renal de Células Claras (Caki-1) en condiciones de hipoxia

Palomar, Lucas Sebastián; Melana Colavita, Juan Pablo; Aguirre, María Victoria; Gay, Claudia Carolina; Rodríguez, Juan Pablo.

lucaspalomar@yahoo.com.ar

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura
Universidad Nacional del Nordeste

Resumen

La proteólisis extracelular es uno de los principales mecanismos por lo que la transformación de la matriz intercelular se desarrolla, y facilita la metástasis tumoral. Las enzimas que la catalizan se denominan metaloproteinasas de la matriz (MMPs); son proteinasas pertenecientes a una amplia familia, que se asocian con tumorigénesis, renovación de la matriz extracelular y la migración de células cancerosas, control del crecimiento, inflamación y angiogénesis. Dados estos roles tan centrales en la biología del cáncer, desde hace tiempo vienen siendo estudiadas, pero son prácticamente inexistentes los trabajos que las relacionan con su expresión en condiciones hipóxicas y más aún en Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC). Por tal motivo, en el presente trabajo, se inició la caracterización de la expresión de MMPs secretadas por células Caki-1, modelo celular ampliamente validado para el CRCC.

Utilizando un modelo *in vitro* de cultivo celular se generó hipoxia con el agregado de CoCl_2 (100, 200 y 300 μM) y se evaluó si la hipoxia influye en la actividad proteolítica del sobrenadante celular. Se utilizó SDS-PAGE para analizar el perfil proteico y la técnica de zimografía para determinar la actividad gelatinolítica. Asimismo, se estudió la expresión de las MMPs (2, 9 y 13) por Dot-Blott.

Los resultados hallados muestran que la hipoxia exacerba la actividad proteolítica de estas células, y que en dicha actividad están implicadas las enzimas MMP-2 y MMP-13, principalmente y en menor grado MMP-9, secretadas al medio extracelular. Actualmente, se está expandiendo la búsqueda de otras isoformas de MMPs (tales como MMP1, MMP8, MMP 21) y evaluando su expresión en el otro modelo validado de CRCC, las células Caki-2.

Palabras clave: CRCC, MMPs, cáncer renal.

Introducción

De las muertes atribuidas al cáncer, el 90% se deben a las metástasis, y los tratamientos que las previenen o eliminan siguen siendo difíciles de alcanzar. Actualmente, están surgiendo datos que indican que la hipoxia y la matriz extracelular (ECM) podrían tener un papel crucial en el desarrollo de metástasis. Originalmente se pensó que la hipoxia y la ECM eran colaboradores independientes de la diseminación metastásica, pero estudios recientes han establecido un vínculo directo entre estos dos factores, lo que sugiere un nuevo modelo en el que múltiples señales microambientales pueden convergir para influir de forma sinérgica en la capacidad metastásica de un tumor (Gilkes et al., 2014; Kitamura et al., 2015; Sorokin, 2010). La proteólisis extracelular es uno de los principales mecanismos por lo que la transformación de la matriz se desarrolla y las enzimas que la catalizan se denominan metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Además de su papel en la renovación de la matriz extracelular y la migración de las células cancerosas, las MMPs regulan las vías que controlan el crecimiento celular, la inflamación, o angiogénesis e incluso pueden funcionar de una manera no proteolítica de señalización. Estos aspectos de la función de MMP están reorientando los enfoques para la terapia del cáncer (Kessenbrock et al., 2010; Ley

et al., 2007; Nathan, 2002; Sabharwal and Schumacker, 2014; Walther et al., 2015).

Por lo anterior, resulta imprescindible disponer de metodologías centradas en la medición de la expresión y actividad de estas enzimas, bajo diferentes condiciones, para aplicarlas al estudio de tumores. De esta manera, en el presente trabajo, se evaluó la actividad proteolítica (gelatinolítica) de MMPs presentes en sobrenadante de células Caki-1 bajo condiciones de hipoxia químicamente generadas.

Objetivos

- Caracterizar la expresión de MMPs por zimografía en células Caki-1, modelo celular ampliamente validado para el carcinoma renal de células claras
- Evaluar si la hipoxia celular tiene influencias en la actividad proteolítica de las MMPs en células Caki-1

Materiales y Métodos

1. Cultivos Celulares y Tratamientos

Se utilizaron células Caki-1. Las líneas se mantuvieron en nitrógeno líquido (-200°C) hasta el momento de uso y se utilizó como medio de cultivo Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (GIBCO-Invitrogen) con el agregado de 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (GIBCO-Invitrogen), L-Glutamina (29,2 mg/mL), Penicilina (10,000 unidades/mL) y Estreptomina (10,000

$\mu\text{g/mL}$) (GIBCO-Invitrogen) como antibióticos (Fogh, 1978; Von Roemeling et al., 2013). En todo momento se trabajó con monocapas confluentes (80%). Las células fueron despegadas con Tripsina-EDTA 0.25% (GIBCO-Invitrogen) al momento de subcultivar.

Las condiciones de hipoxia fueron obtenidas químicamente mediante el agregado de CoCl_2 100, 200 y 300 μM (Ma et al., 2015) y las monocapas celulares fueron mantenidas por 24 y 48hs con medio de cultivo DMEM sin SFB.

2. *Obtención de los sobrenadantes y determinación de la concentración de proteínas*

Un mL de los sobrenadantes de cultivos (SC; controles y tratados) fueron concentrados hasta 250 μL con tubos para centrifuga con filtro AMICON de 10 kDa (Merk, Millipore). La concentración de proteínas de los SC se determinó por absorbancia a 280 nm, utilizando albúmina bovina como patrón.

3. *SDS-PAGE*

Los SC (controles y tratados) fueron acondicionados para el análisis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras. La electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% se realizó según el método de Laemmli (1970), y se sembraron 12 μL de SC (control y tratados) por calle. Las

bandas de proteínas se revelaron con tinción de Coomassie Brilliant Blue R-250.

4. *Zimografía de sobrenadantes de células en hipoxia*

La actividad gelatinolítica de las MMPs presentes en el sobrenadante de cultivo se ensayó mediante zimografía. Se preparó un gel de poliacrilamida 10% (m/v) al cual se adicionó 200 μL de solución de gelatina 0,1 g/mL (disuelta en PBS) por cada 10 mL de gel de corrida. Las muestras (control y tratada) se diluyeron con tampón de muestra sin 2-mercaptoetanol. Se llevó a cabo la corrida electroforética (12 μL de SC, control y tratados, por calle) y, al finalizar la misma, se colocó el gel en solución de Triton X-100 2,5% (v/v) durante 15 min a temperatura ambiente. Se repitió una vez más el procedimiento anterior, y luego se removió parcialmente el Triton X-100, dejándose 2-3 mL en la cuba. Se adicionaron 100 mL de tampón de revelación [Tris 50 mM; NaCl 150 mM; CaCl_2 5 mM; NaN_3 0,02% (m/v); pH 7,4], se agitó durante 15 min a temperatura ambiente, y se incubó a 37 °C durante 16 h. Finalmente, el gel se tiñó con Azul de Coomassie R250.

5. *Inmunodetección de MMPs*

La identificación de MMPs presentes en el sobrenadante celular se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos monoclonales (anti-MMP-2; MMP-9 y

MMP-13; Santa Cruz Biotechnology®) en un ensayo de dot-blott. Se pipetearon los diferentes sobrenadantes concentrados (5 μ L) en una membrana de nitrocelulosa (Biorad) y se secaron a temperatura ambiente durante dos horas. Luego se lavaron una vez con TBS - Tween 20, 0,1% (v/v) y se bloquearon con albúmina de suero bovino (1% en TBS-Tween 20) durante una hora a 37°C, con agitación. Luego, las tiras se lavaron una vez con TBS-Tween 20 y se incubaron inmediatamente con los diferentes anticuerpos una hora a 37 °C. Se detectaron los anticuerpos unidos con un conjugado de peroxidasa de IgG de cabra anti-mouse (Sigma, 1:500 en TBS) incubando las tiras en las mismas condiciones. Finalmente, se lavaron las membranas, se revelaron con 4-cloro-1-naftol (Sigma; 0,03% en Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, con 0,03% de H₂O₂ /OPD) y se documentaron. Se ensayaron los controles correspondientes.

Resultados y Discusión

1. *La hipoxia celular incrementa la actividad proteolítica del sobrenadante de células Caki-1.*

Con el objeto de evaluar la actividad proteolítica (y por ende una medida de la capacidad metastásica) de células Caki-1, monocapas de cultivos celulares fueron desarrolladas en las condiciones señaladas previamente. La hipoxia celular se logró por adición de CoCl₂ en

diferentes proporciones (100; 200 y 300 μ M) por 24 (no mostrado) y 48 h. Posteriormente, los SC fueron colectados, concentrados y luego el perfil proteico se evaluó por SDS-PAGE luego de 48 h de hipoxia (Figura 1.A). Se observan bandas en el rango de 50 – 200 kDa siendo las más intensas las de 50 y 100 kDa, masas moleculares compatibles con las de MMP humanas.

La Figura 1.B muestra la zimografía de los sobrenadantes concentrados de células Caki-1, donde se puede evidenciar una mayor actividad gelatinolítica en las muestras sometidas a condiciones de hipoxia por 48 h, respecto al control.

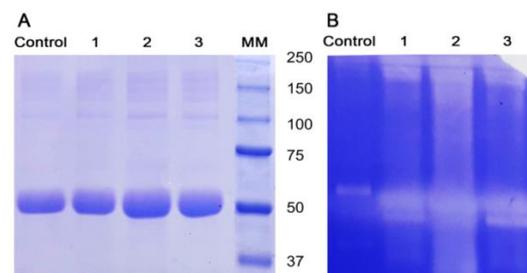


Figura 1. Actividad proteolítica de sobrenadante de células Caki-1 bajo condiciones de hipoxia por 48 h. A.

Perfil electroforético de proteínas en el SC de control y tratamientos. MM: marcador de masa molecular **B.** Zimografía de los SC control y tratamientos. 1-3: SC de células Caki-1 bajo condiciones de hipoxia generadas por el agregado de de CoCl₂ 100; 200 y 300 μ M, respectivamente.

2. Inmunodetección de MMP2, MMP9 y MMP13 en el sobrenadante de células Caki-1 en hipoxia

Con el objeto de atribuir a metaloproteinasas de matriz la actividad proteolítica del sobrenadante, se ensayó la inmunodetección de tres metaloproteinasas en el mismo: MMP2, MMP9 y MMP13 (Figura 2). MMP2 y MMP13 mostraron fuerte reactividad con las proteínas del sobrenadante a diferencia de MMP9, lo cual podría implicar diferencias en las cantidades relativas de todas ellas.

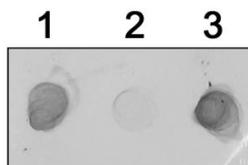


Figura 2. Análisis de reactividad por Dot-blott de IgG anti-MMP2 (1), anti-MMP9 (2) y anti-MMP13 (3) con proteínas del sobrenadante celular. Se ensayaron todos los controles negativos y positivos correspondientes (no mostrado).

Previamente otros trabajos han destacado la importancia clínica de la expresión de MMPs en cáncer como una medida de la capacidad metastásica de los mismos (Kerenidi et al., 2016), sin embargo poco se ha investigado sobre la temática en CRCC. En nuestro leal entender, hasta el momento solo se ha constatado que la expresión de MMP-7 en tejidos CCRCC

fue significativamente mayor en comparación con un grupo control, en un estudio de inmunohistoquímica de tumores (Patraki and Cardillo, 2007) y que sus genes también se encuentran sobreexpresados (Kallakury et al., 2001). Así, en este trabajo se reporta por primera vez la implicancia de la hipoxia en la expresión de MMPs en CRCC y asimismo se sugiere la participación de MMP2, MMP9 y MMP13 en el proceso. Actualmente, se están realizando ensayos de Western Blot para identificar las MMPs y expandiendo la búsqueda de otras isoformas (tales como MMP1, MMP8, MMP21). Asimismo, se evaluará su expresión en el otro modelo validado de CRCC, las células Caki-2.

Conclusiones

Los resultados hallados muestran que la hipoxia exagera la actividad proteolítica de estas células, y que en dicha actividad están implicadas las enzimas MMP-2 y MMP13, principalmente y en menor grado MMP-9, secretadas al medio extracelular. Actualmente se está expandiendo la búsqueda de isoformas de metaloproteinasas y evaluando su expresión en el otro modelo validado de Carcinoma Renal de Células Claras, las células Caki-2.

Bibliografía

Fogh, J., 1978. Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on

- kidney, testis, and bladder tumors. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 5–9.
- Gilkes, D.M., Semenza, G.L., Wirtz, D., 2014. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 14, 430–439. doi:10.1038/nrc3726
- Kallakury, B. V, Karikhalli, S., Haholu, A., Sheehan, C.E., Azumi, N., Ross, J.S., 2001. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7, 3113–3119.
- Kerenidi, T., Kazakou, A.P., Lada, M., Tsilioni, I., Daniil, Z., Gourgoulanis, K.I., 2016. Clinical Significance of Circulating Osteopontin Levels in Patients With Lung Cancer and Correlation With VEGF and MMP-9. *Cancer Invest.* 1–8. doi:10.1080/07357907.2016.1223301
- Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., 2010. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141, 52–67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- Kitamura, T., Qian, B.Z., Pollard, J.W., 2015. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* 15, 73–86. doi:10.1038/nri3789
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678–689. doi:10.1038/nri2156
- Ma, X., Gu, L., Li, H., Gao, Y., Li, X., Shen, D., Gong, H., Li, S., Niu, S., Zhang, Y., Fan, Y., Huang, Q., Lyu, X., Zhang, X., 2015. Hypoxia-induced overexpression of stanniocalcin-1 is associated with the metastasis of early stage clear cell renal cell carcinoma. *J. Transl. Med.* 13, 1–14. doi:10.1186/s12967-015-0421-4
- Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846–852. doi:10.1038/nature01320 [doi]nature01320 [pii]
- Patraki, E., Cardillo, M.R., 2007. Quantitative immunohistochemical analysis of matrilysin 1 (MMP-7) in various renal cell carcinoma subtypes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 20, 697–705.
- Sabharwal, S.S., Schumacker, P.T., 2014. Mitochondrial ROS in cancer: *Nat. Publ. Gr.* 14, 709–721. doi:10.1038/nrc3803
- Sorokin, L., 2010. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 712–723. doi:10.1038/nri2852

Von Roemeling, C.A., Marlow, L.A., Wei, J.J., Cooper, S.J., Caulfield, T.R., Wu, K., Tan, W.W., Tun, H.W., Copland, J.A., 2013. Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 2368–2380. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3249

Walther, V., Hiley, C.T., Shibata, D., Swanton, C., Turner, P.E., Maley, C.C., 2015. Can oncology recapitulate paleontology? Lessons from species extinctions. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* doi:10.1038/nrclinonc.2015.12.

Financiamiento

El presente de trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas (LIBIM) del IQUIBA-NEA, en el marco de una beca de Pregrado otorgada por la Secretaria General de Ciencia y Técnica- UNNE.