



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

Doctorado en Ciencias Biomédicas

**“Análisis de marcadores de la transición epitelio-
mesénquima en células de epitelio mamario no
tumoral en respuesta a leptina”**

T E S I S

Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. JOSÉ ALFREDO VILLANUEVA DUQUE

DIRECTORES DE TESIS
DR. EDUARDO CASTAÑEDA SAUCEDO
DR. NAPOLEÓN NAVARRO TITO

Chilpancingo, Gro. Octubre de 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 18 días del mes de abril del dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutoral designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Análisis de marcadores de la transición epitelio-mesénquima en células de epitelio mamario no tumoral en respuesta a leptina", presentada por el alumno José Alfredo Villanueva Duque, para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutoral



 Dr. Eduardo Castañeda Saucedo
 Dirección de tesis




 Dra. Natividad Castro Alarcón



 Dr. Alejandro Millán Vega




 Dr. Fernando Aureliano Candanedo González

V. B. 

 Dra. Isela Parra Rojas
 Coordinadora del Posgrado de la Unidad
 Académica de Ciencias Químico Biológicas



 Dra. Analia Vences Velázquez
 Directora de la Unidad Académica de Ciencias
 Químico Biológicas


 Coordinación del
 Posgrado de la FCQB
Coordinación 2014-2018

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo, Guerrero.

Bajo la dirección de

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo y
Dr. Napoleón Navarro Tito

Y con la asesoría de

Dra. Natividad
Dr. Alejandro Millán Vega
Dr. Fernando Aureliano Candanedo

El presente trabajo fue financiado por el proyecto SEP/Conacyt con clave CB-2014-01-239870 otorgado al Dr. Napoleón Navarro Tito. Durante el periodo en que cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, el C. José Alfredo Villanueva Duque recibió beca CONACYT (Febrero 2013-Enero 2016)

ÍNDICE

	Página
Resumen	5
Introducción	6
Cáncer de mama.....	6
Obesidad, leptina y cáncer de mama.....	6
Transición epitelio-mesénquima.....	7
Metaloproteinasas e invasión celular.....	10
Capítulo 1	
Leptin induces epithelial-mesenchymal transition in a FAK-ERK dependent pathway in MCF10A mammary non-tumorigenic cells.....	14
Capítulo 2	
La leptina induce transición epitelio-mesénquima a través de la activación de P13K y promueve la invasión de células MCF10A en cultivo.....	24
Anexos	41

Resumen

Introducción: La Transición Eitelio-Mesenquimal (TEM) es un proceso de transdiferenciación mediante el cual las células epiteliales cambian a un fenotipo mesenquimal, este evento está implicado en la progresión tumoral y la metástasis, mediante cambios a nivel de expresión, función y/o activación de proteínas como son las cadherinas y Vimentina, así como incremento en la capacidad migratoria e invasiva de las células.

Objetivos: Evaluar el efecto de la leptina, sobre los niveles de expresión de marcadores de la transición epitelio-mesenquimal en células epiteliales mamarias MCF10A y determinar si estos cambios son dependientes de las cinasas FAK, ERK y PI3K. **Metodología:** Se realizaron ensayos de migración por cierre de herida y se empleó Western blot para determinar los niveles proteicos de Vimentina, E-cadherina y Snail, así como la fosforilación de FAK, ERK y PDK1; además se evaluó la participación de estas cinasas mediante el uso de inhibidores específicos. La secreción de MMP-2 y MMP-9 se evaluó mediante ensayos de zimografía y la invasión celular mediante ensayos en cámaras Transwell. **Resultados** La leptina promueve cambios morfológicos de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal en células MCF10A acompañados de incremento en la migración celular y aumento en la expresión de vimentina de manera proporcional al incremento de la dosis de leptina a través de la actividad cinasa de FAK, ERK y P13K, en el caso de E-cadherina hubo una disminución de su expresión a las 3 h de tratamiento con leptina. Se evaluaron otros marcadores como las MMP-2 y MMP-9, las cuales incrementaron su secreción en respuesta a leptina, y el incremento en la expresión de Snail fue proporcional al tiempo. **Conclusiones:** Estos resultados sugieren que leptina promueve la transición epitelio-mesenquimal por incremento en la capacidad migratoria e invasiva de las células MCF10A.

INTRODUCCIÓN

Cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres a nivel mundial, en México es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres con más de 5,600 defunciones reportadas en el año 2012 (Globocan, 2012). Se han identificado diversos factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de cáncer de mama, se considera que el 60% de los cánceres mamarios son hormono-dependientes, de ahí que los principales factores de riesgo son los relacionados con la exposición crónica a estrógenos. Existen también factores relacionados con la predisposición genética, como tener antecedentes familiares con cáncer de mama u ovario que incluye sólo el 10% de todos los carcinomas mamarios (Rich *et al* 2015), esto debido a mutaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2* entre otros, lo que confiere un riesgo de por vida de padecer cáncer de mama (Ford *et al* 1998, Thompson *et al* 2011). Entre los factores relacionados al estilo de vida de los pacientes se encuentran el consumo de alcohol, el tabaquismo y sobresaliendo de manera importante los malos hábitos alimenticios y el sedentarismo que conllevan a desarrollar el sobrepeso y la obesidad (Danaei *et al* 2005, Wu *et al* 2013, Chen *et al* 2014, Lahmann *et al* 2004), ya que en estas personas existe un incremento en la producción de adipocinas asociadas al desarrollo y progresión de procesos malignos (Gorar *et al*, 2008).

Obesidad, leptina y cáncer de mama

La Organización Mundial de la Salud define como individuos obesos a aquellos que tienen un índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m²; estudios epidemiológicos sugieren que el sobrepeso y la obesidad están relacionados con un incremento en el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer, entre los que destaca el cáncer de mama. Se estima que el 20% de las muertes por cáncer en mujeres son atribuidas al sobrepeso y obesidad (Calle *et al* 2003). El tejido adiposo produce una gran cantidad de adipocinas, las cuales pueden actuar como promotores tumorales, una de estas adipocinas es la leptina la cual es producto del gen *Ob* (localizado en el cromosoma 7) y está formada por 167 aminoácidos (Friedman *et al* 2002), se ha determinado que las concentraciones fisiológicas de leptina en suero oscilan

entre 3 y 5 ng/ml, mientras que en los individuos obesos los rangos van de 8 a 90 ng/ml. Se ha observado que en mujeres con cáncer de mama los niveles de leptina sérica son de 2.77-129.9 ng/ml en comparación con las mujeres sin cáncer de mama cuyos valores son de 0.60-113.1 ng/ml y hasta 670 ng/ml (Mohammadzadeh *et al* 2014).

La leptina tiene como función central la regulación del apetito a nivel hipotalámico, a través de la inhibición del neuropéptido Y (NPY), y de esta manera producir saciedad y controlar la ingesta alimentaria (Houseknecht *et al* 1997). La leptina actúa a través de un receptor membranal del cual se conocen 6 isoformas denominadas Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf, de estas, la isoforma ObRb es la isoforma larga del receptor. Tras la interacción de la leptina con su receptor, este puede activar diferentes vías de señalización en diferentes tipos de células o promover una comunicación cruzada con el receptor ErbB. La unión de la leptina con el receptor Ob-Rb induce la fosforilación del Ob-Rb generando sitios de acoplamiento para moléculas cascada abajo y la activación de las vías como son STAT3, MAPK y STAT5 (Cirillo *et al* 2008). Por otro lado, la cinasa JAK2 acoplada al LPER puede activar al sustrato del receptor de insulina (IRS 1/2), el cual se une a las subunidades p85 y p110 de PI3K, esta cinasa está involucrada en procesos como la invasión en células epiteliales (El Homsí *et al* 2007). También se ha demostrado que la leptina puede estimular la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular, migración e invasión en células MCF-7 (Perera *et al* 2008). Estos resultados sugieren que la leptina participa de manera importante en la regulación de la invasión y metástasis de células de cáncer de mama como las MCF-7 (Yuan *et al* 2014). En este contexto, un evento crucial para que las células adquieran capacidades invasivas y migratorias es la transición epitelio-mesénquima (TEM), proceso mediante el cual se cambia el patrón de expresión de proteínas de células epiteliales para transdiferenciarse a células mesenquimales (Kalluri *et al* 2009).

Transición epitelio-mesénquima en células MCF10A

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso de transdiferenciación de las células epiteliales a células con fenotipo mesenquimal (Kalluri y Weinberg 2009); este proceso incluye una serie de etapas como son la pérdida de características epiteliales como

la pérdida de uniones célula-célula y reorganización del citoesqueleto, lo cual resulta en la pérdida de polaridad ápico-basal, la disminución de la expresión de genes como *CDH1* (gen de E-cadherina) y la ganancia de la expresión de genes que codifican proteínas que proporcionan a las células características mesenquimales como N-cadherina, vimentina, fibronectina y secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs), entre otras. Estos le confieren a las células incremento en las capacidades migratorias, invasivas y metastásicas. Además, los elementos del citoesqueleto son reorganizados y se forman fibras de estrés, filopodios y lamelipodios, los cuales participan en la migración celular.

E-cadherina es una proteína transmembranal que se une al complejo de cateninas mediante su dominio extracelular, mientras que a través de su dominio citoplasmático interactúa con el citoesqueleto de actina. Existen tres residuos de serina en el dominio citoplasmático (Ser⁶⁸⁴, Ser⁶⁸⁶, Ser⁶⁹²) de E-cadherina que son fosforilados por las proteínas cinasas CK2 y GSK3 β , lo cual crea interacciones adicionales con β -catenina, resultando en un importante incremento en la afinidad de la interacción con el complejo de cateninas. Por otro lado, la fosforilación de las tirosinas Tyr⁴⁸⁹ y Tyr⁶⁵⁴ de beta-catenina rompe la unión con E-cadherina y con α -catenina (Nelson, 2008). Este complejo es necesario para la estabilización de las adhesiones intercelulares mientras que en ausencia de esta unión se altera la señalización de β -catenina-factor celular T (TCF) dando como consecuencia la activación de genes que estimulan la proliferación celular como c-myc y ciclina-D1. En el caso de catenina p120, participa en la correcta localización membranal de E-cadherina, cuando catenina p120 es liberada del complejo de adhesión y se acumula en el citoplasma, reprimiendo la actividad de RhoA y activa a Rac y Cdc42 y por ende la formación de protrusiones membranales como los lamelipodios y filopodios favoreciendo la migración celular (Yilmaz y Christofori, 2010).

El gen *CDH1* puede ser reprimido transcripcionalmente por una variedad de factores de transcripción como Snail 1 (Batlle *et al* 2000), Slug (Bolós *et al* 2002), Twist (Kang *et al* 2004), los cuales se unen a secuencias consenso (5'-CACCTG-3') en el promotor de *CDH1* denominadas cajas-E. Estos factores de transcripción pueden ser expresados en respuesta a diferentes estímulos como hipoxia, señalización de la vía de Wnt, factores de crecimiento, entre los que destaca el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), estímulos con

proteínas de la matriz extracelular (MEC) como colágeno o fibronectina y pérdida de la expresión de Sim2 (Peinado *et al* 2004).

Otra proteína relacionada con la TEM es vimentina, la cual es un componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto que se ha relacionado con cambios morfológicos de fenotipo mesenquimal, aumento en la migración, adhesión celular, formación de lamelipodios y contactos focales, por lo que su sobreexpresión se considera como marcador mesenquimal de células tumorales (Helfand *et al* 2010, Tsurata y Jones 2003). El mecanismo por el cual vimentina favorece el desarrollo de la TEM es mediante la activación de Axl, integrina $\beta 4$ (ITGB4) y el activador de plasminógeno urocinasa (PLAU), produciendo cambios morfológicos de tipo mesenquimal e incremento de la migración celular (Vuoriluoto *et al* 2011). Se ha demostrado que vimentina previene la desfosforilación de ERK a través del bloqueo de su fosfatasa. Por otro lado, la cinasa Akt se une a vimentina fosforilada protegiéndola de proteólisis inducida por caspasas lo cual incrementa la motilidad. También vimentina se ha relacionado con otras proteínas como son Scrib y Axl para promover directamente la migración e invasión celular (Ivaska 2011).

Uno de los mejores modelos para evaluar la TEM son las células de epitelio de mama no tumoral MCF10A, debido a que al ser células no tumorales pueden semejar el proceso de la TEM que puede ocurrir *in vivo* durante el inicio y progresión del cancer mama en las mujeres. En este sentido se ha evaluado la TEM en MCF10A con TGF- β como inductor de la TEM a través de la proteína Hic-5, la cual promueve un incremento en la degradación de la matriz extracelular, así como de la invasión a través de la formación de invadopodios y la secreción de MMP-2 y MMP-9 (Pignatelli *et al* 2012, Tomaskovic-Crook *et al* 2009). Por otro lado, se ha reportado el análisis de los marcadores de la TEM bajo el estímulo de ácido araquidónico y ácido linoléico en donde se observó una disminución de los niveles de expresión de E-cadherina y un aumento en la expresión de N-cadherina y vimentina; así como la secreción de MMP-9 (Martínez-Orozco *et al*, 2010, Espinoza-Neira *et al*, 2011). Espinoza *et al* (2011) evaluaron estímulos con colágena tipo IV como inductor de la TEM en células MCF10A, dónde encontraron que induce un incremento en la expresión de N-cadherina, vimentina y la secreción de MMP-9. En 2012 Yan *et al*, evaluaron a la leptina como inductora de la TEM en células MCF-7 y MDA-MB-231 y reportaron que la leptina

requiere de la activación de β -catenina vía Akt/GSK3 y MTA1/Wnt para inducir la transdiferenciación al fenotipo mesenquimal.

Un evento muy importante de la TEM es la invasión celular por parte de las células epiteliales transformadas, entre los marcadores de la TEM que participan en este evento destacan las metaloproteinasas y la formación de estructuras como son los invadopodios los cuales en conjunto pueden favorecer la invasión.

Metaloproteinasas e invasión celular

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son enzimas con actividad proteolítica, es decir tienen como función degradar a proteínas de la MEC, estas proteínas participan también en el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, migración e invasión, así como en la regulación de la angiogénesis. Se han caracterizado 23 MMPs en humanos que incluyen 17 solubles (secretadas) y seis asociadas a membrana plasmática, las cuales difieren entre sí en la arquitectura y en la especificidad de su sustrato. Las MMPs se han clasificado en colagenasas (MMP1,-8 y -13), gelatinasas (MMP2/9), estromelisininas (MMP3,-10 y -13) y matrilisininas (MMP7) debido al tipo específico de los componentes de la MEC que degradan (Cascales *et al* 2009). Se ha reportado que las MMP-9 y la MMP-2 tienen un papel importante en la progresión tumoral, ya que facilitan la degradación de proteínas de la matriz extracelular, como es la colágena tipo IV, la cual es de las proteínas más abundantes en las células somáticas, favoreciendo de esta manera que las células puedan invadir la MEC hasta llegar a vasos sanguíneos o linfáticos y continuar con el desarrollo de la metástasis. Durante la invasión y metástasis las células tumorales cruzan barreras como la membrana basal epitelial hasta invadir el estroma, posteriormente realizan intravasación a vasos sanguíneos y/o linfáticos para finalmente extravasarse y establecer una nueva colonia tumoral llamada metástasis. Durante la invasión existe remodelación del citoesqueleto de actina y la formación de protrusiones de la membrana celular con capacidad invasiva llamadas invadopodios, los cuales se diferencian de los filopodios principalmente por ser estables durante un mayor número de horas, tener un tamaño y calibre mayor y en la forma y estructura de los filamentos de actina de las protrusiones

(Murphy y Courtneidge, 2012). La invasión de las células a través de la MEC es un proceso que incluye la formación del invadopodio y perforación de la MEC, posteriormente la extensión y elongación del invadopodio a través de la MEC y finalmente la migración de las células a través de la matriz (Murphy *et al*, 2011).

Como ya se ha mencionado existe una importante asociación de la obesidad y los niveles de leptina sérica con el inicio y progresión del cáncer de mama y la leptina, esta asociación puede involucrar la TEM debido a que la leptina induce migración, invasión celular y cambio en la expresión de marcadores de la TEM en líneas celulares de cáncer de mama. Sin embargo, no se ha reportado si la leptina puede inducir TEM en células de epitelio mamario no tumoral MCF10A y mediante que vías de señalización pudieran estar ocurriendo estos eventos, el modelo propuesto en la línea celular MCF10A puede imitar la TEM que pudiera estar ocurriendo *in vivo* debido a que estas células tienen características epiteliales y no tienen la capacidad de formar tumores por lo que los cambios de fenotipo mesenquimal dependerían del efecto de la leptina utilizada en los cultivos celulares

Referencias

- Bolós, V., Peinado H., Pérez-Moreno M.A., Fraga F.M., Esteller M., Cano A., (2002). The transcriptional factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of Cell Science*, (116) pp.499-511.
- Battle, E., Sancho E., Francí C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. *Nature Cell Biology*, (2) pp.84-89.
- Cascales, M., Álvarez J. A. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm*, 76 (1) pp. 59-84.
- Calle, E. E , Rodriguez C , Walker-Thurmond K et al (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *N Engl J Med*, (348) pp.1625-1638.
- Chen, C., Huang Y.B., Liu X.O., Gao Y., Dai H.J., Song F.J., et al. (2014). Active and passive smoking with breast cancer risk for Chinese females: a systematic review and meta-analysis. *Chin J Cancer*, 33(6) pp.306-16.
- Cirillo, D., Rachiglio A.M., Montagna R., Giordano, A., Normanno, N., (2008). Leptin signaling in breast cancer: An overview. *J Cell Biochemistry*, (105) pp.956-964.
- Danaei, G., Vander H., Lopez A.D., Murray C.J., Ezzati M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioral and environment risk factors. *Lancet*, (366) pp.1784-1793.
- El Homsí, M., Ducroc R., Claustre J., Jourdan G., Gertler A., Estienne M., Bado A., Scoazec J.Y., Plaisancié P. (2007). Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *Am J Physiology*, 293 (1) pp. G365-G373.
- Espinoza-Neira, R, Mejia-Rangel J., Cortes-Reynosa P., Perez Salazar P. (2011) Linoleic acid induces an

EMT like process in mamary epitelial cells MCF10A. *Int J biochem*, (43) pp.1782-1791.

Ford, D., Easton D.F., Stratton M., Narod S., Goldgar D., Devilee P., et al. (1998). Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *Am. J Hum Genet*, (62) pp.676.

Friedman, J.M. (2002). The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev*, 60 (10) pp. S1-S14.

Globocan, 2012, globocan.iarc.fr/ [sitio de internet] France. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/>

Gorar, S., Culha C., Demir Y., Turgut A.T., Karakaya P., Serter R., Aral S., Aral Y. (2008). Obesity and adipocytokines. *Endocrine Abstracts*, (16) P562.

Helfand, B.T., Mendez M.G., Murthy S.N., Shumakera D.K., Grinb B, Mahammad S. et al. (2011). Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia *Mol Biol of the Cell*, (22) pp.1274-89.

Houseknecht, K.L., Baile C.A., Matteri R.L., Spurlock M.E., (1997) The Biology of Leptin: A review. *J Anim Sci*,(76) pp.1405-1420.

Ivaska J., Vimentin, Central hub in EMT induction? (2011). *Small GTPases*, (2) pp.51-53.

Kalluri, R. (2009). EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*, (119) pp. 11417-19.

Kalluri, R., Weinberg R. (2009). The basics pf epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119 (6) pp. 1420-8.

Kang, Y., Massagué J., (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell*, (118) pp.227-279.

Lahmann, P.H., Hoffmann K., Allen N., van Gils C.H., Khaw K.T., Tehard B., et al. (2004). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*, (111)762-771.

Martínez-Orozco, R., Navarro-Tito, N., Soto-Guzman A., Castro-Sanchez, L. Pérez S. E., (2010). *European J Cell Biol*, (89) pp.476-488.

Mohammadzadeh, G., Ghaffari, M., Bafandeh, A. & Hosseini, S. (2014). Association of serum soluble leptin receptor and leptin levels with breast cancer. *J Res Med Sci*, 19(5) pp.433–438.

Murphy, G., Nagase H. (2011). Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment. *FEBS J*, 278(1) 2-15.

Murphy, D.A., Coutneidge S.A. (2012). The ins and outs of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(7):413-426.

Nelson, W.J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 2) pp.149-55.

Peinado, H., Portillo F., Cano A., (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*. (48) pp.365-375.

Perera, C.N., Chin, H.G., Duru, N., Camarillo, I.G. (2008). Leptin-regulated gene expression in MCF breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression. *Endocrinol*,

(199) pp.221-33.

Pignatelli, J., Tumbarello, D.A., Schmidt, R.P., Turner C.E., (2012). Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol*, (3) pp. 421-437

Rich, T. A., Woodson A H, Litton J, Arun B (2015). Hereditary breast cancer syndromes and genetic testing *Journal of Surgical Oncology*, (111) pp.66-80.

Tomaskovic-Crook, E.,Thompson EW, Thiery JP. (2009) Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Research*, (11) pp.213.

Thompson, D., Easton D., (2001). Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am. J. Hum Genet*, (68) pp.410-419.

Tsuruta, D., Jones JCR. (2003).The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J of Cell Sci*, (116) pp.4977-4984.

Yan, D., Avtanski D., Saxena N. J., Sharma D., (2012). Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt protein-dependent pathways. *J Biol Chem*, (11) pp.8598-8612.

Yilmaz, M., Christofori G. (2010). Mechanisms of motility and metastasizing cells. *Mol Cancer Research*, (8) pp.629-642.

Yuan, H.J., Sun K.W., Yu K. (2014).Leptin promotes the proliferation and migration of human breast cancer through the extracellular-signal regulated kinase pathway. *Mol Med Rep*, 9(1) pp.350-4.

Vuoriluoto, K., Haugen H., Kiviluoto S., Mpindi JP., Nevo J., Gjerdrum C., (2011) Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, (30) pp.1436-48.

Wu, Y., Zhang D., Kang S., (2013). Physical activity and risk of breast cancer: a meta- analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*, (137) pp.869- 882.

CAPITULO I

Leptin induces partial epithelial-mesenchymal transition in a FAK-ERK dependent pathway in MCF10A mammary non-tumorigenic cells

Original Article

Leptin induces partial epithelial-mesenchymal transition in a FAK-ERK dependent pathway in MCF10A mammary non-tumorigenic cells

Villanueva-Duque Alfredo¹, Zuniga Eulogio Miriam Daniela¹, Dena-Beltran Jose¹, Castaneda-Saucedo Eduardo¹, Calixto-Galvez Mercedes¹, Mendoza-Catalán Miguel Angel², Ortuno-Pineda Carlos³, Navarro-Tito Napoleon¹

¹Laboratorio de Biología Celular del Cancer, ²Laboratorio de Biomedicina Molecular, ³Laboratorio de Acidos Nucleicos y Proteinas, FCQB, Universidad Autónoma de Guerrero, Mexico

Received May 28, 2017; Accepted August 2, 2017; Epub September 1, 2017; Published September 15, 2017

Abstract: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a biological process involved in different steps of tumor progression and metastasis of breast cancer cells. Epidemiological studies suggest a link between obesity and the progression of breast cancer. Leptin is an adipocyte-secreted hormone which can promote cell migration and invasion as part of EMT in breast cancer cells. We investigated the effect of leptin on expression of EMT markers in MCF10A cells, as well as, the role of FAK and ERK in this process. We found that leptin induces morphological changes from an epithelial phenotype towards a mesenchymal phenotype and promotes cell migration in MCF10A cells. Moreover, leptin induces an increase in vimentin expression, changes in the cellular localization of E-cadherin and increase in FAK and ERK phosphorylation. Furthermore, using FAK and ERK chemical inhibitors we show that leptin regulates EMT markers in a FAK and ERK dependent manner. In conclusion, leptin promotes vimentin expression and cell migration in a FAK and ERK dependent pathway in the non-tumorigenic epithelial cell line MCF10A.

Keywords: Leptin, EMT, cell migration, breast cancer

Introduction

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a biological process characterized by a cell transdifferentiation from an epithelial phenotype towards a mesenchymal phenotype. EMT is an essential process during embryonic development, wound healing, fibrosis and tumor progression. During EMT, cells of epithelial origin lose their epithelial characteristics and acquire a mesenchymal phenotype characterized by a fibroblastoid morphology, increased migratory and invasive potential, and resistance to anoikis [1-4]. At the molecular level, EMT is accompanied by changes in actin organization, downregulation of E-cadherin, increased expression of N-cadherin, vimentin, Twist, Snail, as well as, an increase in MMPs secretion, and activation of signaling pathways that contribute to the

increased migratory and invasive capacities of the cells [2-5].

Leptin is an adipocyte-secreted hormone, which plays a key role in the regulation of food intake and energy expenditure through binding to the leptin receptor (ObR) [6, 7]. However, leptin and the ObR receptor have been reported to be overexpressed in ductal and lobular breast cancer as well as node lymph metastasis, suggesting an important role for both proteins in tumor development and/or progression [8, 9].

Leptin promotes the activation of several signaling molecules including the JAK/STAT canonical signal pathway, PI3K, Rho GTPases, and kinases such as FAK and ERK [10-12]. FAK and ERK kinases are involved in the regulation of cell adhesion, motility, invasion, survival,

angiogenesis, and they have recently been associated with EMT [13]. FAK activation occurs canonically when integrins bind to extracellular matrix proteins or through activation of growth factor receptors. FAK undergoes autophosphorylation on Tyr397, generating a high-affinity binding site for proteins containing SH2 domains, such as the Src kinase. The interaction between Src and FAK promotes Src autophosphorylation and its subsequent activation. Active Src phosphorylates Tyr576 and Tyr577 in the kinase domain of FAK, promoting its maximum catalytic activity. In addition, Src induces FAK phosphorylation at Tyr925, generating a docking site for Grb2, leading to the activation of the MAPK pathway [13, 14]. It has been reported that ERK is involved in EMT and promotes the expression of regulatory factors such as ZEB and Twist [15, 16].

In the present study, we show that leptin promotes a switch from an epithelial to a mesenchymal phenotype in MCF10A mammary epithelial cells, increased cell migration, changes in the subcellular localization of E-cadherin, and an increase in the expression of vimentin, as well as, the activation of FAK and ERK. Together, our results suggest that leptin promotes EMT in a FAK/ERK-dependent manner in MCF10A cells.

Materials and methods

Recombinant human leptin, ERKI (3-(2-Aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl) methylene)-2, 4-thiazolidinedione) and FAK (PF-573228) inhibitors were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO.). Anti-E-cadherin, anti-Vimentin, anti-Actin and anti-FAK antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA.). Anti-ERK and anti-p-ERK1/2 were purchased from Millipore (Billerica, MA.). Phosphospecific Ab to FAK was obtained from Invitrogen (Waltham, MA.).

Cell culture

The non-tumorigenic mammary epithelial cell line, MCF10A, was cultured in DMEM/F12 (50:50) medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 10 mg/ml insulin, 0.5 mg/ml hydrocortisone, 20 ng/ml recombinant epidermal growth factor and antibiotics 1% in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. For experimental purposes, confluent cultures of these cells were serum-starved for

6 h before treatment with FAK and ERK inhibitors and/or leptin.

Cell stimulation

MCF10A cells were grown in 60-mm dishes containing 4 ml of DMEM/F12 until confluence. Cells were washed with PBS, and treated with inhibitors and/or leptin for the times and concentrations indicated. Cell stimulation was terminated by aspirating the medium, and cells were solubilized in 0.5 ml of ice-cold RIPA buffer, containing 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% SDS and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF).

Western blot

Cell lysates were resolved on 10% SDSpolyacrylamide gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with 1:1,000 dilutions of primary antibodies overnight at 4°C, followed by 2 h incubation with a 1:5,000 dilution of secondary HRP-conjugated antibodies (Millipore) at room temperature. Immunoblots were developed using an ECL chemiluminescent detection reagent (GE Health care). Blot data were analyzed using ImageJ software and compiled from three independent experiments.

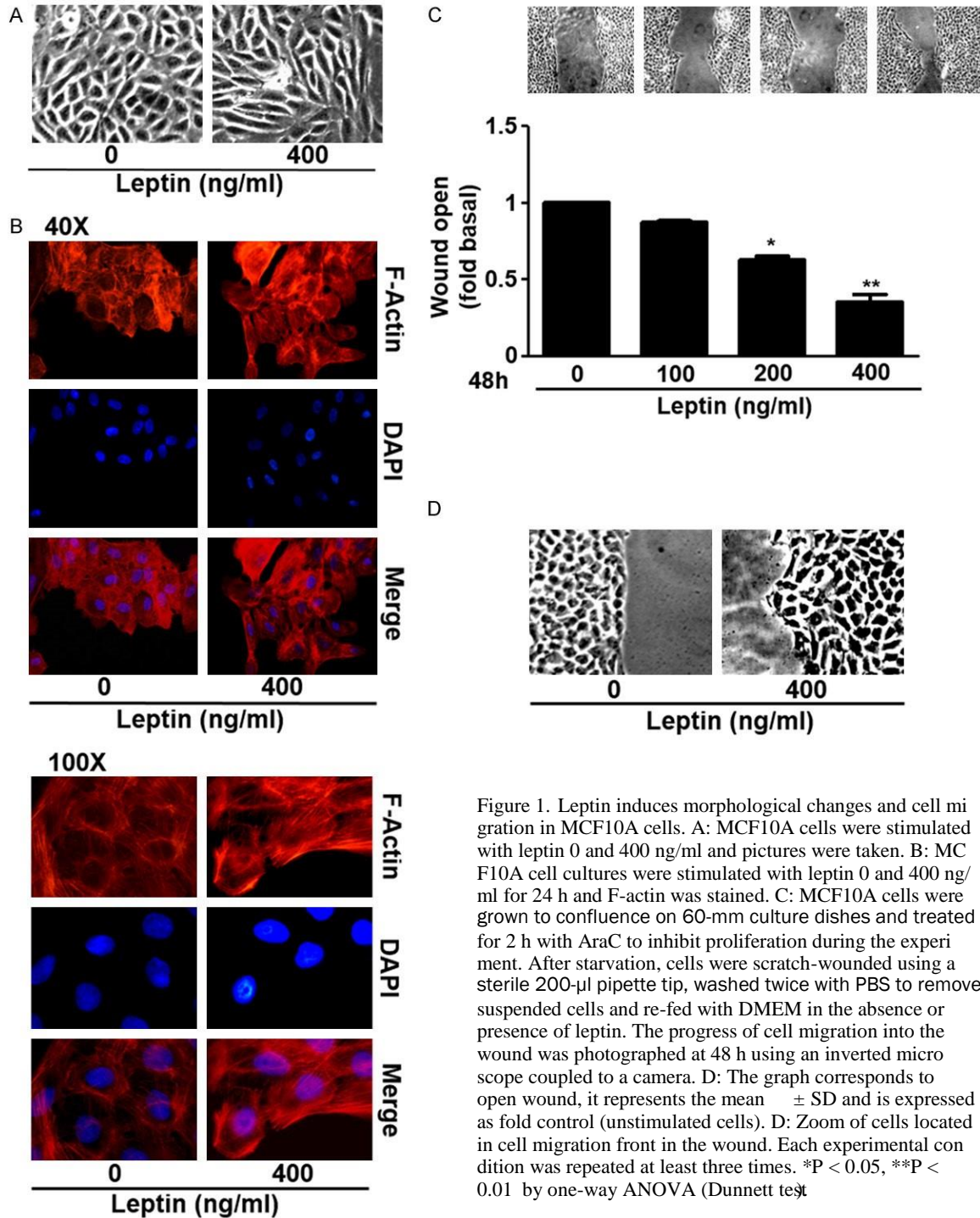
Immunofluorescence and F-actin staining

MCF10A cells were seeded on glass coverslips and grown to 70% confluence, then stimulated with or without leptin during 24 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton-X100 in PBS for 5 min at room temperature. For IF, cells were blocked with 3% albumin in PBS for 1 h at room temperature. E-cadherin and Vimentin primary antibodies were used at a 1:250 dilution. Antirabbit secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen) was used at a 1:750 dilution. Immunofluorescence images were acquired with an Olympus BX43 microscope, under 100X objectives. For F-actin staining, cells were incubated with Rhodamine Phalloidin (1:500) for 30 min at room temperature, images were acquired with an Olympus BX43 microscope, under 40× and 100× objectives.

Scratch-wound assays

MCF10A cells were grown to confluence on 60-mm culture dishes. Cells were starved for 6 h in DMEM/F12 without FBS and treated for with

AraC (Cytosine β -D-Arabinofuranoside) to inhibit proliferation. After starvation, cells were scratch-wounded using a sterile 200- μ l pipette



tip, washed twice with PBS to remove a 10 \times suspended cells and re-fed with DMEM/F12 without FBS, in the absence or presence of inhibitors and/or leptin. The progress of cell

migration into the wound was photographed at 48 h using an Olympus BX43 microscope using objective. The open area was determined by measuring the total area of the wound using the ImageJ software. Each experimental condition was repeated at least three times.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and the comparisons were performed using Newman-Keuls and Dunette's multiple comparison test. Statistical probability of $P < 0.05$ was considered significant.

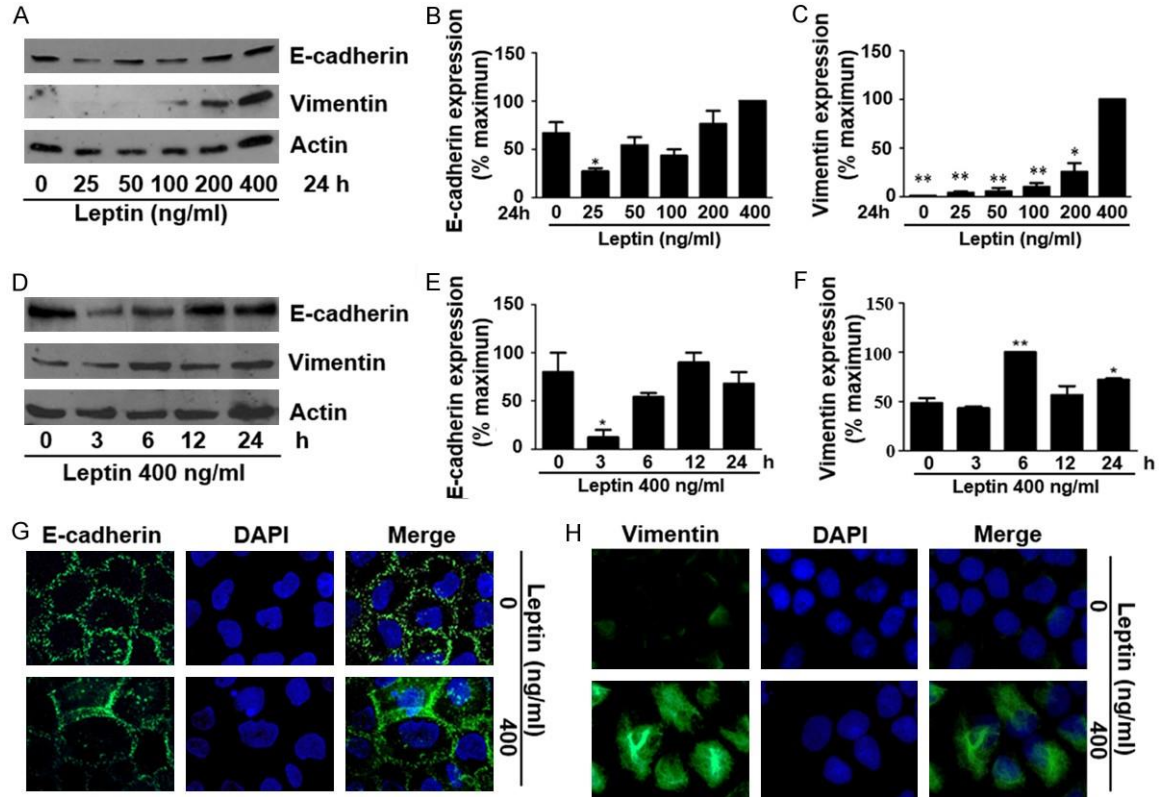


Figure 2. Leptin regulates E-cadherin and vimentin expression and cellular location in MCF10A cells. A: MCF10A cells were treated with leptin 0, 25, 50, 100, 200 and 400 ng/ml for 24 h and lysates were obtained. B, C: The graphs represent the densitometric and statistical analysis of the bands obtained by Western blot. The graphs represent the mean \pm SD of at least three independent experiments and are expressed as changes respect to the control (unstimulated cells). D: MCF10A cells were treated with leptin 400 ng/ml for various times 0, 3, 6, 12 and 24 h and lysates were obtained. E-cadherin expression was analyzed by Western blotting using anti-E-cadherin and anti-vimentin Abs. The membranes were re-probed using anti-actin Ab as loading control. E, F: The graphs represent the mean \pm SD of at least three independent experiments and are expressed as changes with respect to the maximum percentage. G, H: Cells cultures were grown in coverslips and treated with or without leptin 400 ng/ml for 24 h, fixed and incubated with anti-E-cadherin and incubated with anti-vimentin Abs. Asterisks denote comparisons made to unstimulated cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by one-way ANOVA (Dunnett test).

FAK and ERK inhibition assays

MCF10A cell cultures were pretreated for 1 h with FAK (PF-573228) or ERK (ERKI) inhibitors, then the medium was aspirated, and cell cultures were refed with DMEM/F12 medium with inhibitors and/or leptin for 24 h according to each experiment. Total protein extracts were obtained as described above and vimentin expression was analyzed by WB.

0.05 was considered significant.

Results

Leptin induces morphological changes and cell migration in MCF10A cells

To determine the effect of leptin on EMT markers, we first evaluated the effect of leptin on cell morphology. As shown in **Figure 1A**,

leptin treatment results in a switch from a cuboid epithelial morphology to an enlarged mesenchymal phenotype. Moreover, we observed stress fiber formation in cells that were stimulated with leptin (Figure 1B). To investigate whether leptin induces cell migration in MCF10A cells, the cells were treated with 0, 100, 200 or 400 ng/ml of leptin for 48 h, and migration was evaluated by scratch-wound assays. As shown in Figure 1C, the treatment with leptin promotes an increase in cell migration, with a max-

showing a fibroblast-like morphology at the front of the migration group (Figure 1D).

Leptin regulates E-cadherin and vimentin expression and cellular location in MCF10A cells

To examine whether leptin induces changes in E-cadherin and vimentin expression, confluent cultures of MCF10A cells were treated with vehicle or with 25, 50, 100, 200 or 400 ng/ml of leptin for 24 h (dose-response assays), or stimulated with 400 ng/ml of leptin for

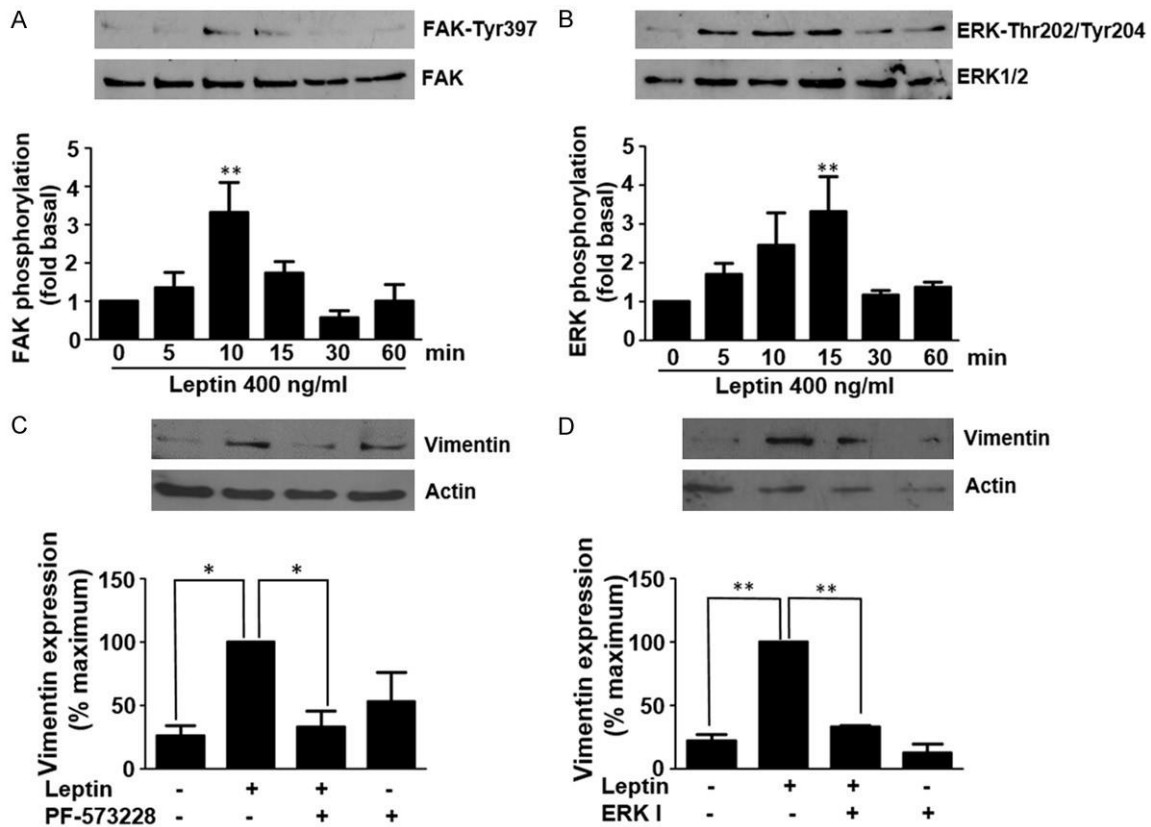


Figure 3. Leptin promotes an increase of vimentin expression in a FAK- and ERK-dependent manner. (A) MCF10A cells were treated with leptin 400 ng/ml for various times and lysates were obtained. FAK activation was analyzed by Western blotting using an anti-p-Tyr397 FAK antibody. The membranes were re-probed using anti-FAK Ab as loading control. (B) MCF10A cells were treated with leptin 400 ng/ml for various times and lysates were obtained. ERK activation was analyzed by Western blotting using an anti-p-Thr202-Tyr204 ERK antibody. The membranes were re-probed using anti-ERK Ab as loading control. (C) Cultures were untreated (-) or treated (+) with PF-573228 10 mM and leptin 400 ng/ml for 24 h and lysed. Lysates were analyzed by Western blot using an anti-vimentin Ab and anti-actin Ab as loading control. (D) Cultures were untreated (-) or treated (+) with ERK I 30 mM and leptin 400 ng/ml for 24 h and lysed. Lysates were analyzed by Western blot with an anti-vimentin Ab and anti-actin Ab as loading control. The graphs represent the mean \pm SD of three independent experiments, comparisons were made respect to control cultures (unstimulated). Results shown are representative of at least three independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01 by one-way ANOVA analysis (Dunnett test, B, C; and Neuman-Keuls test, C, D).

imum migration observed at 400 ng/ml of leptin. In addition, we observed that leptin induces collective cell migration, with cells

different times (time-course assays). As shown

in **Figure 2A, 2B**, a significant decrease on the levels of E-cadherin was observed when the cells were treated with 25 and 100 ng/ml of leptin. However, when the cells were treated with 50, 200 or 400 ng/ml of leptin, no significant change in E-cadherin expression was observed. Furthermore, leptin treatment induces an increase in vimentin levels in a dosedependent manner (**Figure 2A, 2C**).

To evaluate whether the changes in E-cadherin and vimentin expression in response to leptin is time-dependent, we stimulated MCF10A cells with 400 ng/ml of leptin for 0, 3, 6, 12 and 24 h. We found that leptin induces a decrease on E-cadherin levels only at 3 h of stimulation

15, 30 and 60 min. Leptin treatment induces an increase in FAK phosphorylation (Tyr397), reaching a maximum peak of phosphorylation at 10 min (**Figure 3A**). Similarly, leptin treatment induced an increase on ERK phosphorylation (Thr202/Tyr204) reaching a maximum phosphorylation level at 15 min (**Figure 3B**). To establish the role of FAK and ERK kinases in leptin-induced vimentin expression, MCF10A cells were incubated in the absence or presence of chemical inhibitors for FAK (PF-573228 10 μ M) or ERK (ERKI), and stimulated with or without 400 ng/ml of leptin for 24 h. We found that in the presence of FAK or ERK inhibitors, no increase in vimentin expression was observed in response to leptin (**Figure 3C, 3D**).

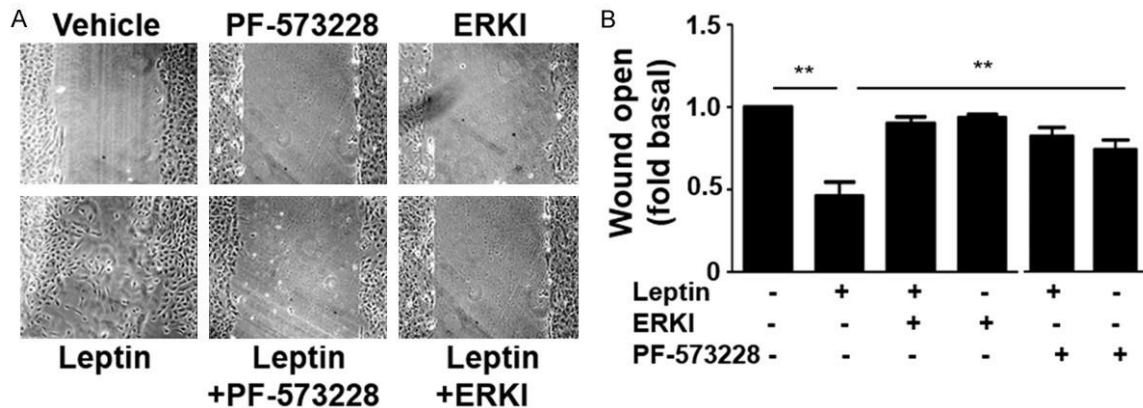


Figure 4. Leptin promotes cell migration in a FAK- and ERK1/2-dependent manner. A: Cell cultures were scratchwounded and treated with vehicle (Tris HCl pH 7.4), leptin 400 ng/ml, leptin 400 ng/ml + PF-573228 10 mM, PF573228 10 mM, leptin 400 ng/ml + ERKI 30 mM and, ERKI 30 mM. Pictures were taken at 48 h after wounding. B: The graphs are the quantification of open wound area and represent the mean \pm SD of the percentage of total open area of the experiment. Results shown are representative of at least three independent experiments. Statistic significance: **P < 0.01 by one-way ANOVA analysis (Newman-Keuls test).

(**Figure 2D, 2E**), whereas increased vimentin levels were observed at 6 and 24 h of treatment (**Figure 2D, 2F**). Interestingly, by immunofluorescence we notice that in MCF10A cells stimulated with leptin 400 ng/ml for 24 h, there is a subcellular relocalization of E-cadherin from de plasma membrane to the cytoplasm of the cell (**Figure 2G**). Furthermore, we notice an increase in vimentin expression with a perinuclear distribution in cells stimulated with leptin (**Figure 2H**).

Leptin promotes an increase of vimentin expression in a FAK- and ERK-dependent manner

To evaluate the effect of leptin on FAK and ERK phosphorylation, MCF10A cultures were treated with 400 ng/ml of leptin for 0, 5, 10,

Leptin promotes cell migration in a FAK- and ERK1/2-dependent manner

Finally, we evaluated the involvement of FAK and ERK kinases in leptin-induced cell migration. Our results show that in the presence of PF-573228 or ERKI, the leptin-induced increase in cell migration was abolished; suggesting that cell migration induced by leptin is dependent on FAK and ERK kinases (**Figure 4**).

Discussion

Several epidemiological studies have shown a strong relationship between obesity and the development and progression of breast cancer

[17]. Recently, it has been shown that high serum concentration of leptin is correlated with the onset and progression of breast cancer [18]. Moreover, leptin promotes EMT in several cancer cell lines in culture [19-21]. It has been reported that leptin induces EMT in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, promoting the decrease in E-cadherin expression and increase in Fibronectin, N-cadherin, vimentin and Snail [22]. In this study, we evaluated the effect of leptin treatment on EMT markers in the non-tumorigenic mammary epithelial cell line MCF10A. Our results show that leptin promotes a morphological switch from an epithelial to a mesenchymal phenotype, which is accompanied by an increase in stress fiber formation and vimentin expression, as well as an increase in cell migration, suggesting that leptin induces EMT in these cells. However, leptin-treated MCF10A cells show a collective cell migration behavior and although leptin induces a partial redistribution of the epithelial marker E-cadherin at the plasma membrane, there is no decrease of E-cadherin expression, which may explain the collective cell migration phenotype observed in this study. Our results are in agreement with data reported by other groups, showing that inducers such as collagen IV, arachidonic acid and linoleic acid induce a partial EMT in MCF10A cells, which is characterized by collective cell migration [23-25]. Partial EMT has been associated with the formation of clustered tumor cells that are more resistant to apoptosis and have a higher potential for tumor formation than those that are circulating individually [23], and it has been demonstrated that leptin can induce apoptosis resistance in cancer cells in culture [26, 27]. Recently, it was demonstrated that leptin induces the self-renewal of normal breast stem cells, suggesting that this might be a mechanism that increases the risk of developing breast cancer, as it has been hypothesized that breast stem cells may be the initiators of breast cancer [28]. Taken together, these data support the active role of leptin in breast cancer initiation and progression. On one hand, by increasing stem cell population, and therefore increasing the target cells for carcinogenesis. On the other hand, it induces EMT, which promotes migration and dissemination of breast cancer cells. Finally, leptin may induce resistance to apoptosis. These antecedents and the findings described in our study support the idea that leptin is involved in different steps of carcinogenesis, either by increasing the population of cancer stem cells or promoting EMT, resistance to

apoptosis and survival in circulation stimulating metastasis.

FAK and ERK are two kinases involved in cellular events such as cell proliferation and migration. Overexpression or hyperactivation of these proteins has been reported at different stages of tumor progression, including EMT [29-31]. Here, we evaluated the role of FAK and ERK in the regulation of leptin-induced changes in EMT markers. Our data show that leptin induces the activation of both FAK and ERK kinases, and that leptin-induced migration of MCF10A cells is dependent on the activation of these kinases. In other studies, cytosolic kinases such as Src and FAK have been reported to be involved in the control of collective cell movement [32]. In addition, ERK has been shown to play an important role in cell migration in MCF7 cells, in the induction of EMT in thyroid and pancreatic cancer cells [33, 34]. Recently, it has been reported that leptin has the ability to promote migration in MCF7 cells in an ERK, Akt and STAT3 dependent pathway [35]. These data demonstrate that the processes related to partial EMT in our experimental model are related to the kinase activity of FAK and ERK.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from SEPCONACYT CB-2014-01-239870. A. V-D was supported by a CONACYT predoctoral training grant. We thank Travis Ashworth for the style corrections of this manuscript.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Navarro-Tito Napoleon, Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, FCQB, UAGro. Av. Lazaro Cardenas s/n Chilpancingo, Gro. 39090, Mexico. Tel: 7474725503; Fax: 747472-5503; E-mail: nnavarro@uagro.mx

References

- [1] Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 365-375.
- [2] Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell

- migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000; 148: 779-790.
- [3] Helfand BT, Mendez GM, Murthy NSP, Shumaker DK, Grin B, Mahammad S, Aebi U, Wedig T, Wu YI, Hahn KM, Inagaki M, Herrmann H, Goldman RD. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 1274-1289.
- [4] Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C, Lorens JB, Ivaska J. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* 2011; 30: 1436-48.
- [5] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 178-196.
- [6] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei KSM, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 80: 543-546.
- [7] Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-3.
- [8] Jarde T, Caldefie-Chezet F, Damez M, Mishellany F, Penault-Llorca F, Guillot J, Vasson MP. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. *Oncol Rep* 2008; 19: 905911.
- [9] Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, Russo A, Sulkowski S, Surmacz E. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1447-1453.
- [10] Catalano S, Mauro L, Marsico S, Giordano C, Rizza P, Hago V, Montanaro D, Maggiolini M, Panno ML, Andó S. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor α in MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 19908-19915.
- [11] Attoub S, Noe V, Pirola L, Bruyneel E, Chastre E, Mareel M, Wymann MP, Gespach C. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J* 2000; 14: 2329-38.
- [12] Spina A, Maiolo F, Esposito A, Sapio L, Chiosi E, Sorvillo L, Naviglio S. cAMP elevation downregulates β 3 integrin and focal adhesion kinase and inhibits leptin-induced migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biores Open Access* 2012; 1: 324-32.
- [13] Lee BY, Timpson P, Horvath LG, Daly RJ. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacol Ther* 2015; 146: 132149.
- [14] Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Patricia JK. *Oncogene* 2009; 28: 4326-4343.
- [15] Malaguarnera R, Belfiore A. The emerging role of insulin and insulin-like growth factor signaling in cancer stem cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 1-15.
- [16] Kotiyal S, Bhattacharya S. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453: 112-116.
- [17] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 16251638.
- [18] Barone I, Giordano C, Bonofiglio D, Ando S, Catalano S. Leptin, obesity and breast cancer: progress to understanding the molecular connections. *Curr Opin Pharmacol* 2016; 31: 8389.
- [19] Li Z, Shen J, Wu WKK, Yu X, Liang J, Qiu G, Liu J. The role of leptin on the organization and expression of cytoskeleton elements in nucleus pulposus cells. *J Orthop Res* 2013; 31: 847857.
- [20] Feng H, Liu Q, Zhang N, Zheng L, Sang M, Feng J, Zhang J, Wu X, Shan B. Leptin promotes metastasis by inducing an epithelial-mesenchymal transition in A549 lung cancer cells. *Oncol Res* 2013; 21: 165-171.
- [21] Yoon KW, Park SY, Kim JY, Lee SM, Park CH, Cho SB, Lee WS, Joo YE, Lee JH, Kim HS, Choi SK, Rew JS. Leptin-induced adhesion and invasion in colorectal cancer cell lines. *Oncol Rep* 2014; 31: 2493-2498.
- [22] Yan D, Avtanski D, Saxena NK, Sharma D. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3- and MTA/Wnt1 protein dependent pathways. 2012; 287: 85988612.
- [23] Jolly MK, Jia D, Tripathi SC, Hanash SM, Sendurai A. Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget* 2016; 7: 27076-84.
- [24] Martinez-Orozco R, Navarro-Tito N, Soto-Guzman A, Castro-Sanchez L, Perez Salazar E. Arachidonic acid promotes epithelial-to-mesenchymal-like transition in mammary

- epithelial cells MCF10A. *Eur J Cell Biol* 2010; 89: 476488.
- [25] Espinosa-Neira R, Mejia-Rangel J, CortesReynosa P, Salazar EP. Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 1782-1791.
- [26] Jiang H, Yu J, Guo H, Song H, Chen S. Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 1-5.
- [27] Chen C, Chang YC, Lan MS, Breslin M. Leptin stimulates ovarian cancer cell growth and inhibits apoptosis by increasing cyclin D1 and Mcl-1 expression via the activation of the MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol* 2013; 42: 1113-1119.
- [28] Esper RM, Dame M, McClintock S, Holt PR, Dannenberg AJ, Wicha MS, Brenner DE. Leptin and adiponectin modulate the self-renewal of normal human breast epithelial stem cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2015; 8: 1174-83.
- [29] Golubovskaya VT. NIH Public Access. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; 4: 687-706.
- [30] Cicchini C, Laudadio I, Citarella F, Corazzari M, Steindler C, Conigliaro A, Fantoni A, Amicone L, Tripodi M. TGFbeta-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Exp Cell Res* 2008; 314: 143-152.
- [31] Ning Z, Wang A, Liang J, Xie Y, Liu J, Yan Q, Wang Z. USP22 promotes epithelial-mesenchymal transition via the FAK pathway in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 2014; 32: 1451-1458.
- [32] Serrels A, Canel M, Brunton VG, Frame MC. Src/FAK-mediated regulation of E-cadherin as a mechanism for controlling collective cell movement: insights from in vivo imaging. *Cell Adh Migr* 2011; 5: 360-365.
- [33] Lester RD, Jo M, Campana WM, Gonias SL. Erythropoietin promotes MCF-7 breast cancer cell migration by an ERK/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway and is primarily responsible for the increase in migration observed in hypoxia. *J Biol Chem* 2005; 280: 39273-39277.
- [34] Baquero P, Jiménez-Mora E, Santos A, Lasa M, Chiloeches A. TGF-beta induces epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer cells by both the BRAF/MEK/ERK and Src/FAK pathways. *Mol Carcinog* 2015; 1654: 1639-1654.

CAPITULO II

La leptina induce transición epitelio-mesénquima y promueve la invasión de células MCF10A en cultivo a través de PI3K

La leptina induce transición epitelio-mesénquima y promueve la invasión de células MCF10A en cultivo a través de PI3K

Resumen

La obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo cáncer de mama, debido a que este exceso de tejido adiposo sobreproduce diversas adipocitocinas como la leptina, la cual cumple funciones normales, pero también puede promover eventos relacionados al fenotipo maligno de las células como son, migración, invasión, cambios morfológicos, activación de cinasas citosólicas y cambios en el patrón de expresión de proteínas particularmente de marcadores de la Transición epitelio-mesénquima (TEM), este proceso está relacionado con el inicio y progresión de tumores malignos y el desarrollo de la cascada metastásica. El objetivo fue evaluar la participación de la proteína PI3K como promotora de la TEM en la línea celular MCF10A a través de la vía PI3K/PDK1 y si de esta activación depende la expresión de vimentina, Snail y de la migración celular, observamos que en presencia de Wortmanina hubo una disminución de los marcadores epiteliales, mientras que en presencia de leptina incrementaron los marcadores de fenotipo mesenquimal. Otro evento importante en la TEM es la invasión celular, la cual fue evaluada midiendo la secreción de MMP-2 y MMP-9 y por ensayos en cámaras Transwell en los cuales observamos un incremento en la secreción significativa de MMP-2 y la invasión celular es dependiente de la activación de PI3K/PDK1. Con estos resultados demostramos por primera vez que la leptina promueve la TEM en células MCF10A por una vía dependiente de PI3K.

Introducción

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un evento biológico que ocurre de manera normal en las etapas embrionarias y en la cicatrización de heridas (Kalluri y Weinberg 2009); por otro lado, de manera anormal también participa en el inicio, desarrollo, progresión y metástasis de los carcinomas de origen epitelial (Iwatsuki *et al* 2010). La TEM participa en el desarrollo de cáncer a través de cambios en las células epiteliales, como son la transdiferenciación morfológica de fenotipo epitelial a mesenquimal, pérdida de la polaridad apical-basal, cambios en el perfil de expresión de proteínas como cadherinas, vimentina, fibronectina y factores de transcripción como Snail y Twist, secreción de metaloproteinasas,

incremento en las capacidades migratorias e invasivas de las células epiteliales e incrementando estas capacidades en las células tumorales (Kalluri *et al* 2009), todo esto en conjunto favorece el desarrollo del fenotipo maligno de las células y la promoción del cáncer de mama.

Se han reportado diferentes proteínas que pueden desencadenar este evento, una hormona recientemente documentada que favorece la TEM es la leptina (Yan *et al* 2012, Feng *et al* 2014) la cual de manera fisiológica favorece la saciedad y regula la ingesta alimentaria, pero niveles incrementados y sostenidos de leptina en sangre periférica en estados de sobrepeso y obesidad pueden desencadenar la activación de cinasas citosólicas que contribuyen a los cambios en células epiteliales (Saxena *et al* 2007); en los reportes se ha demostrado la participación de la leptina como inductora de la TEM en células de cáncer de mama; se ha demostrado que la leptina activa a la cinasa PI3K en células de cáncer de ovario, colon, hígado, tiroides y páncreas; en los cuales se demostró que favorecen la proliferación, invasión, migración celular (Li *et al* 2012, Yeh *et al* 2008, Cheng *et al* 2011, Uddin *et al* 2010, Mendonsa *et al* 2015) lo cual pudiera estar sucediendo también en el inicio y desarrollo del cáncer de mama en mujeres obesas.

En el presente estudio demostramos que PI3K la TEM en células de epitelio mamario no tumoral en respuesta a leptina, lo cual fue demostrado al observar cambios en el perfil de expresión de vimentina la cual incrementó en presencia de leptina; la activación de PI3K fue evaluado a través de la activación de PDK1; al emplear el inhibidor Wortmanina observamos una disminución de vimentina y de la migración e invasión celular. Por otro lado, observamos que la leptina incrementó los niveles del factor de transcripción Snail por WB y mediante ensayos de zimografía observamos un incremento en la secreción de las MMP-2: por lo anterior podemos demostrar que la vía PI3K/PDK1 está implicada en el desarrollo de TEM y que estos eventos pueden ocurrir en presencia de hiperleptinemia y que favorece el desarrollo de cáncer de mama en mujeres obesas.

Material y métodos

Reactivos

Leptina recombinante (Sigma-Aldrich), anti-vimentina (V9), anti-Snail, anti-PDK1 fosforilado (Ser241), anti-PDK1 y anti-actina de de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA.). Gelatina de Sigma-Aldrich (St Louis MO.), Commasie G-250. Matrigel de BD (Bedford, MA), cámaras Transwell de BD Biocoat Cellware (San Jose, CA)). Wortmanina, ERKI (3-(2-Aminoethyl)-5((4-ethoxyphenyl) methylene)-2, 4-thiazolidinedione) y FAK (PF-573228) de Sigma-Aldrich (St Louis MO.).

Cultivo celular

Las células de epitelio mamario no tumoral MCF10A fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (50:50) suplementado al 5% con suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich), 10 mg/ml de insulina (Humulin), 0.5mg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 20mg/ml de Factor de crecimiento epidermal (Sigma-Aldrich) y coctel de antibióticos al 1%, a una atmosfera humidificada al 5% de CO₂ a 37°C. Para propósitos experimentales las células fueron desprovistas de suero por 4 h antes de realizar los tratamientos con leptina, PDK1 y Wortmanina.

Estimulación celular

Las células crecieron en cajas de 60mm conteniendo 4ml de DMEM/F12 hasta alcanzar confluencia. Las células fueron lavadas con PBS y tratadas con Wortmanina o leptina a diferentes dosis, al terminar la estimulación el medio fue aspirado y las células solubilizadas en 0.5 ml de buffer RIPA conteniendo 50 mM pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM de ortovanadato de sodio, 100 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de sodio, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1% desoxilato de sodio, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% SDS y 1 mM metilfenilsulfonil fluoruro (PMSF).

Ensayo de migración por cierre de herida

Las células MCF10A se dejaron crecer a confluencia total en cajas de 60 mm, posteriormente fueron puestas en supresión de SFB por 6 h, cuando transcurrieron 2 h de la supresión se

adicionó 0.2 μ l/ml de Ara C para inhibir la proliferación celular trascurridas las 4 h de supresión se realizó una rayadura con una punta de pipeta esteril de 200- μ l y lavadas 2 veces con PBS para remover las celulas suspendidas y se agrego DMEM/F12 sin SFB, se hicieron tratamientos con leptina y Wortmanina. El progreso de la migración celular fue fotografiado a las 48 h usando un microscopio Olympus BX43 acoplado a una cámara fotográfica usando a obojtivo 10x, el area abierta fue determinado al medir el area total usando ImageJ software. Cada condición experimental se realizó por triplicado.

Ensayo de invasión en cámaras Transwell

Los ensayos de invasión en Matrigel fueron realizados usando una cámara de invasión Transwell de BD Biocoat Cellware (San Jose, CA). Las células MCF10A se pusieron en supresión de suero por 4 h, posteriormente fueron resuspendidas y colocadas 1 x10⁵ células en la cámara superior del inserto y 0.1% de SFB, en la cámara inferior se colocó medio 5% de SFB, se hicieron los tratamientos en presencia y ausencia de leptina y de los inhibidores, se incubaron a 37 °C por 48 h. Las células que no invadieron fueron retiradas de la cámara superior con un hisopo de algodón, las células de la cámara inferior fueron teñidas con cristal violeta 1% en PBS, la membrana teñida se colocará en 200 μ l de ácido acético al 10%. Las células fueron fotografiadas a las 48 h con microscopio acoplado a cámara fotográfica y se hizo conteo de células contando en 10 campos diferentes.

Western blot

Las celulas lisadas fueron resuspendidas en geles de poliacrilamida SDS 10%. Las proteínas fueron separadas en geles de acrilamida al 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa, posteriormente fueron bloqueadas usando 5% de leche libre de grasa en buffer de solución salina (PBS) pH 7.2/0.05% Tween 20, se incubaron toda la noche con anticuerpo primario (anti-vimentina, anti-actina, anti-fosfo-PDK1 y anti-PDK1) (1:1000) a 4°C, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05% y se incuban con anticuerpo secundario (1:5000) por 2 hr a 22°C en agitación. Después se realizacon 3 lavados con PBS-Tween 0.05%, las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas con reactivos de visualización HRP Chemiluminescent (NOVEX). Las bandas fueron identificadas en placas radiográficas, la densitometría se realizó usando ImageJ software de tres experimentos independientes.

Zimografía

La actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 fue evaluada a partir de los sobrenadantes de los cultivos de células MCF10A usando geles de acrilamida copolimerizados con 1mg/ml de gelatina, el medio condicionado fue mezclado con buffer de muestra (2.5% SDS, 4µg/ml de rojo fenol), posteriormente se realizó electroforesis a 72 V por 2 h, los geles fueron lavados tres veces con Tritón X-100 al 2.5% para remover SDS y se incubaron con buffer de incubación (50nM Tris/HCl pH 7.4, 5mM CaCl₂) a 37°C por 48 h. Los geles fueron teñidos con azul de Comassie G-250 al 0.25%, metanol al 30% y ácido acético al 10% por 40 min, posteriormente fueron desteñidos con solución desteñidora (etanol 20%, ácido acético 15%) por aproximadamente 40 min, la actividad proteolítica fue detectada como bandas claras en el gel, como controles positivos se usaron sobrenadantes de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados en media \pm desviación estándar, los datos fueron estadísticamente analizados usando one-way ANOVA, las comparaciones fueron realizadas usando Newman-Keuls y Comparación múltiple de Dunnett. Probabilidad estadística de $p < 0.05$ fue considerada significativa.

Resultados y discusión

La leptina promueve la activación de la cinasa PDK1

Existen numerosos reportes de la participación de las cinasas PI3K y PDK1 en el desarrollo de distintos tipos de cáncer incluido el mamario; la activación de estas cinasas se ha relacionado con eventos como la invasión celular y el desarrollo de metástasis a distancia, y por ende en un mal pronóstico clínico de los pacientes (Thorpe *et al* 2015, Du *et al* 2016, Bai *et al* 2016).

En este sentido, evaluamos si la leptina promueve la activación de PDK1, la cual es una cinasa cascada abajo de PI3K y que es considerado como un sustrato directo; para lo cual, mediante WB evaluamos niveles de fosforilación de PDK1 (Ser241) en células MCF10A tratadas con 400ng/ml de leptina por 0, 5, 10, 15, 30 y 60 min. Observamos un incremento

en los niveles de fosforilación de PDK1 a los 5 y 10 min para restablecerse a niveles basales a tiempos mayores (Figura 1), la membrana fue incubada con anti-p-PDK1 utilizado como control de carga a PDK1, con estos ensayos demostramos que la leptina puede activar la vía PI3K/PDK1 en las células MCF10A.

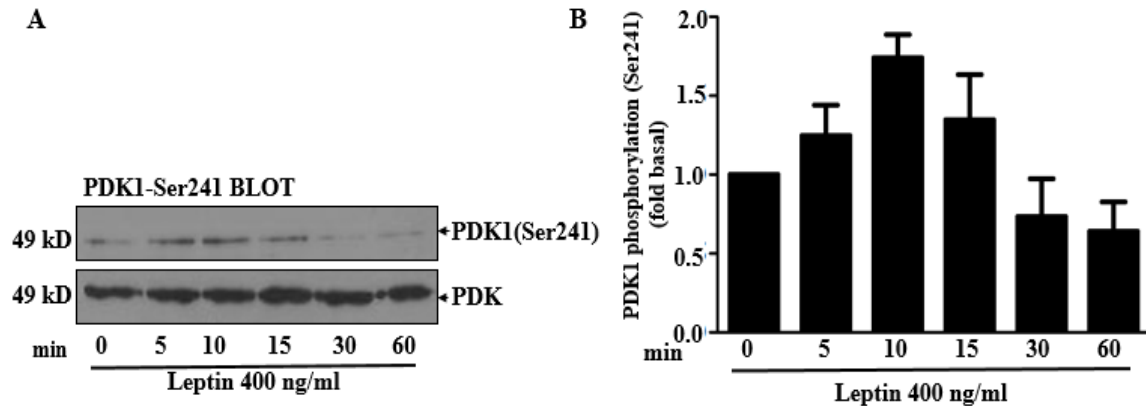


Figura 1. La leptina induce la activación de PDK1. Las células MCF10A fueron tratadas con 400 ng/ml de leptina a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min) y posteriormente fueron lisadas para obtener extractos proteicos. A) Se realizó Western blot para medir niveles proteicos de p-PDK1 y PDK total (control de carga), los datos fueron normalizados con el control (tiempo 0). B) La gráfica corresponden al análisis densitométrico del WB, la comparación se hizo con el control (células no tratadas) y el incremento se expresa como número de veces respecto al control de tres experimentos independientes, como prueba estadística se usó ANOVA de una vía.

Leptina induce el incremento de vimentina por una vía dependiente de la actividad de PDK1

Existe evidencia de que vimentina puede ser activada por PI3K en carcinomas orales (Tseng *et al* 2011), en este sentido, evaluamos mediante WB si la cinasa PDK1 promueve el incremento de vimentina, para lo cual utilizamos células MCF10A tratadas en presencia y ausencia de leptina y de wortmanina (inhibidor de PI3K), y encontramos que los niveles de vimentina disminuyeron en presencia del wortmanina incluso observamos niveles por debajo del basal, posteriormente las membranas fueron incubadas con anti-actina, la cual fue utilizada como control de carga (Figura 2). Con estos ensayos tenemos la evidencia que es a través de PI3K/PDK1 que se regula la expresión vimentina.

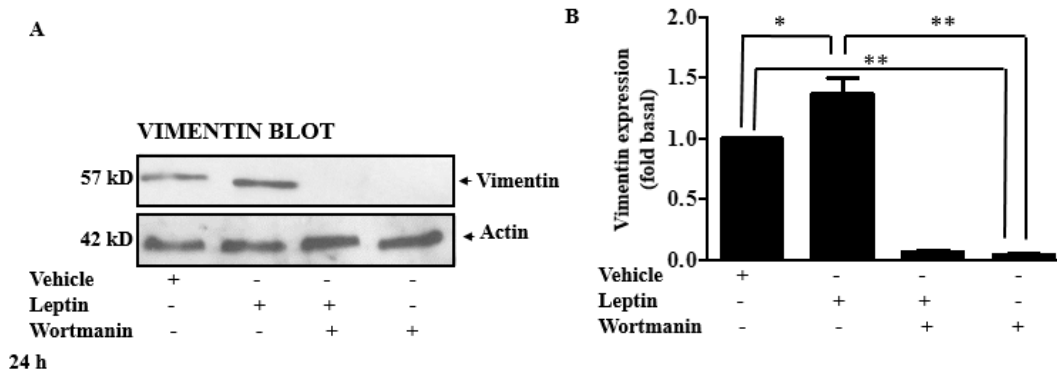


Figura 2. La leptina induce el incremento de vimentina de manera dependiente de la actividad de PI3K en células MCF10A. Los cultivos celulares fueron tratados (+) o no tratados (-) con 10 000 Mm de Wortmanina con 400 ng/ml de leptina por 24 h y posteriormente fueron lisados. Los extractos proteicos fueron analizados por WB con anti-vimentina y anti-actina (control de carga). La grafica representa la media y desviación estándar, las comparaciones se hicieron con los cultivos control (no estimulados). Los resultados representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes por ANOVA de una vía. Significancia estadística: *P<0.05, **P<0.01.

La leptina induce migración celular por una vía dependiente de la actividad de PDK1

En las figuras anteriores la leptina puede inducir la expresión de vimentina vía PI3K/PDK1, por otro lado se ha reportado que vimentina participa de manera importante en la migración celular de células epiteliales y en células de cáncer mama (Gilles *et al* 1999, McInroy *et al* 2007), por lo cual decidimos evaluar si la leptina induce migración celular en cultivos de células MCF10A con y sin leptina y presencia y ausencia de Wortmanina. En la cascada de señalización PI3K/PDK1, PIP3 recluta a la membrana plasmática a tres citosinas serina treonina PDK1, PDK2 y PKB o AKT, a través de su interacción con dominios de homología con pleckstrina (PH); al utilizar wortmanina como inhibidor estamos evidenciando la activación de PI3K de manera indirecta; mediante ensayo por cierre de herida demostramos que en presencia de wortmanina se no hubo migración celular y se mantenía la morfología epitelial mientras que las que fueron tratadas con leptina mostraron incremento de la capacidad migratoria (Figura 3), con estos ensayos tenemos la evidencia de que la migración inducida por leptina depende de la activación de PI3K, se ha reportado que la subunidad p85 de PI3K controla la organización del citoesqueleto de actina y de esta manera se favorece la migración en fibroblastos de ratón y esto pudiera estar comportándose de manera similar en nuestro modelo al ser de tambien células epiteliales (Jimenez *et al* 2000).

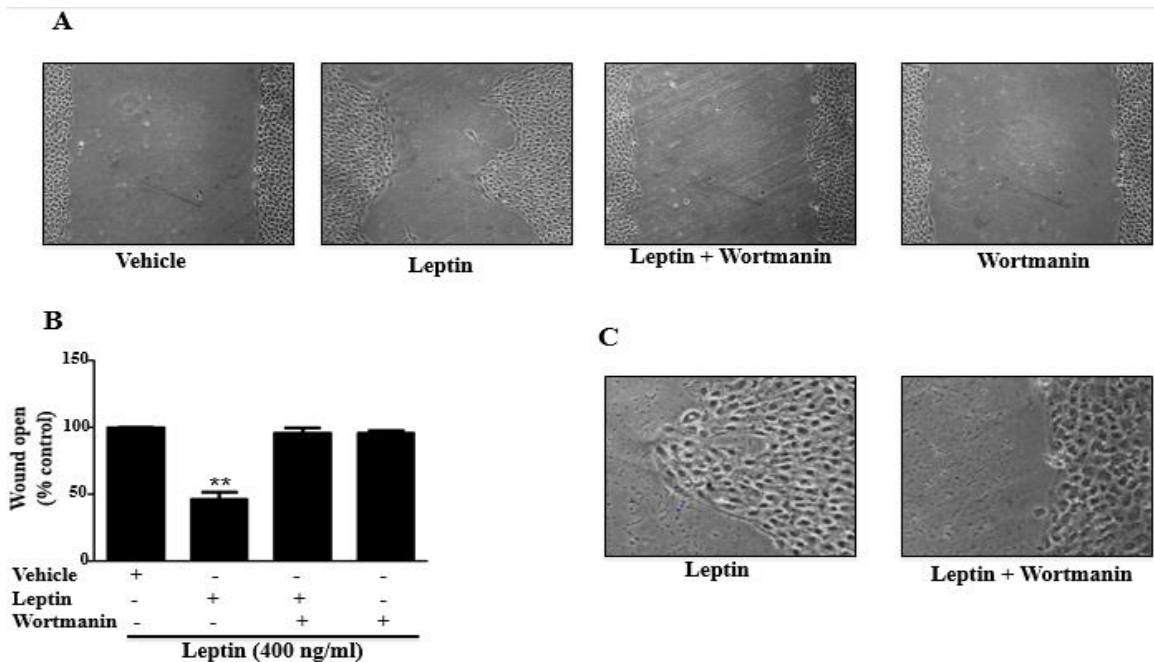


Figura 3. La cinasa PI3K promueve la migración celular inducida por leptina en células MCF10A. Panel A. Se utilizaron cultivos celulares de la línea celular MCF10A a una confluencia total, posteriormente se realizó supresión de suero por 4 h y la realización de la ralladura con una punta estéril, posteriormente empleamos diferentes condiciones experimentales (leptina 400 ng/ml, leptina 400 ng/ml + Wortmanina (10 000 Mm) y Wortmanina (10 000 Mm)) usamos como control células MCF10A sin tratamiento de leptina y sin inhibidor, las fotografías fueron tomadas a las 48 h después de los tratamientos. Panel C. Acercamiento de la herida, la comparación de cambios morfológicos se realizó entre la condición de tratamiento de leptina y tratamiento de leptina + wortmanina. Panel B. La gráfica representa el porcentaje del área abierta de la herida de tres experimentos independientes por ANOVA de una vía. Significancia estadística $**P < 0.01$.

La leptina induce la secreción de MMP-2 y MMP-9 en las células MCF10A

La secreción de metaloproteinasas es un evento clave en la invasión, en éste sentido se ha reportado que la leptina promueve la activación de la MMP-2 vía p38MAPK (Schram *et al* 2010). Otro estudios han reportado que la leptina incrementa la secreción de MMP2 e incrementa la actividad de MMP-9, mientras que el células ováricas la leptina incrementa la actividad pero no la expresión de MMP-2 y MMP-9 (Bilbao *et al* 2009), se ha reportado también que estas MMPs están involucradas en la invasión de células de cáncer de mama en respuesta a leptina (Ahn *et al* 2015).

Para determinar si la leptina induce la secreción de MMP-2 y MMP-9 en células MCF10A se realizó zimografía, los estímulos con leptina se realizaron con 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml de leptina. La actividad proteolítica de las MMP-2 y MMP-9 se observó en el gel como bandas claras que son los sitios donde las MMPs degradaron la gelatina; la actividad proteolítica de la metaloproteinasas 2 se observó incrementada a las dosis de 25 y 50 ng/ml de leptina respecto al control (Figura 4A), en el caso de MMP-9 se observó una activación

mayor en las dosis de 25 ng/ml con respecto al control pero no fue un incremento significativo estadísticamente (Figuras 4B).

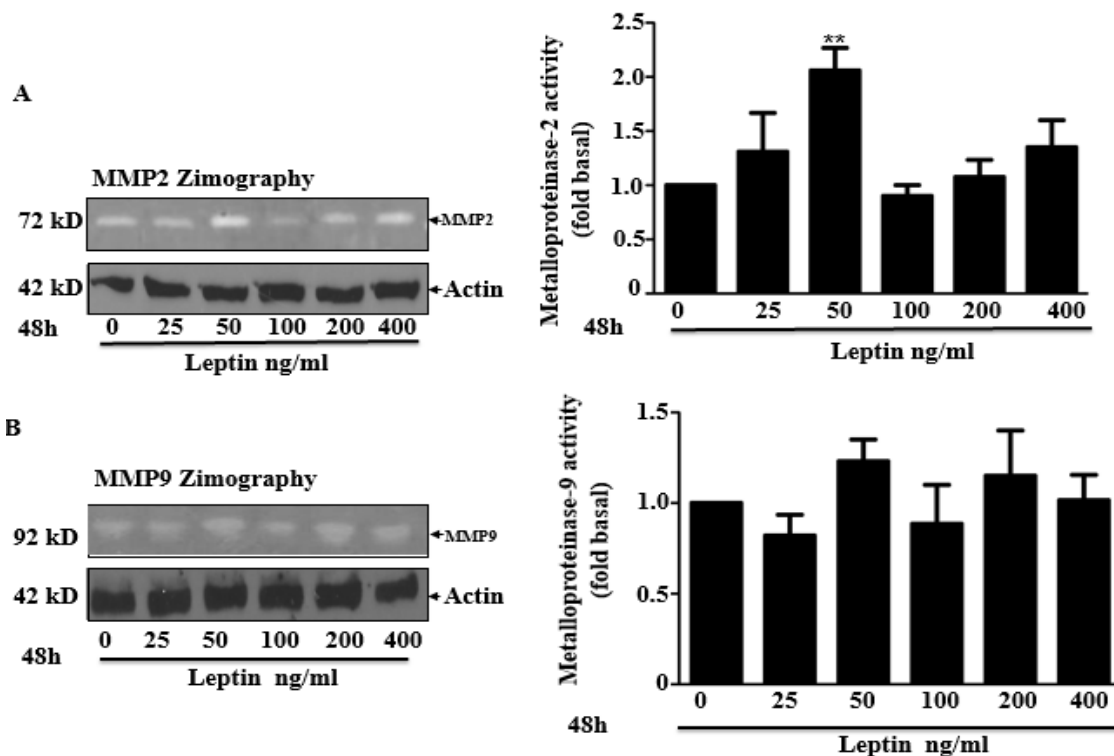


Figura 4. La leptina induce la secreción de la metaloproteínasa-2 y 9. La actividad proteolítica de la MMP-2 y MMP-9 fue analizada en el medio condicionado usando geles copolimerizados con gelatina. los cultivos fueron tratados con leptina a dosis de 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml de leptina por 48 h; se usaron como controles positivos líneas células de cáncer de mama y como control negativo células MCF10A sin tratamiento con leptina. A). Zimografía de la actividad proteolítica de la MMP-2 y MMP-9 (B). Las gráficas corresponden al análisis estadístico del zimograma, como prueba estadística se usó ANOVA, se representa la media y desviación estándar, la comparación se hizo con el control (células no tratadas) y el incremento se expresa como número de veces respecto al control. Los experimentos se realizaron por triplicado. Significancia estadística: *P<0.05.

La leptina induce el incremento del factor de transcripción Snail en células MCF10A

Los factores de transcripción como Snail son considerados como marcadores clásicos de la TEM, los cuales pueden por un lado funcionar como represores del gen de E-cadherina inhibiendo su regulación transcripcional y favoreciendo de esta manera el fenotipo maligno (Battle *et al*, 2000, Nishioka *et al* 2010, Yokohama *et al* 2003). Evaluamos la expresión del factor de transcripción Snail incrementaban en respuesta a leptina mediante WB empleando la dosis de 400 ng/ml de leptina por 0, 3, 6, 12 y 24 h, observamos que los niveles de Snail incrementaron a partir de las 3 h de tratamiento y hasta las 24 h (figura 5). La membrana fue incubada con anti-actina la cual fue usada como control de carga. Otras funciones que se han descrito de Snail son el bloqueo del ciclo celular, supervivencia y resistencia a la radioterapia

y quimioterapia lo cual demuestra que la participación de Snail en la TEM va mas allá de la represión transcripcional de E-cadherina (Vega *et al* 2004, Kurrey *et al* 2009).

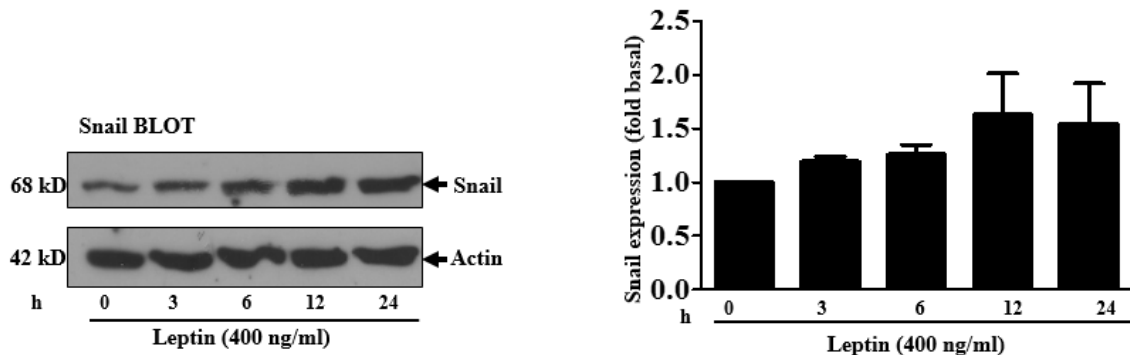


Figura 5. La leptina incrementa los niveles de Snail en células MCF10A. Los cultivos celulares de MCF10A a una confluencia total, posteriormente se realizó supresión de suero por 4 h y tratamiento con leptina (400 ng/ml) por 0, 3, 6, 12 y 24 h, las células fueron lisadas para obtener proteínas totales. A) Se realizó Western blot para medir los niveles proteicos de Snail y actina (control de carga), la comparación se realizó con el control (tiempo 0). La gráfica corresponde a al análisis densitométrico del WB, como prueba estadística se usó ANOVA, se representa la media y desviación estándar, la comparación se hizo con el control (tiempo 0) y el incremento se expresa como el número de veces respecto al control. Los experimentos se realizaron por triplicado.

La leptina induce invasión en células MCF10A a través de la activación de FAK, ERK y PI3K

La invasión es un evento fundamental en el desarrollo de la TEM y de la metástasis a distancia (Naber *et al* 2013) el cual puede ser promovido por la activación de diferentes cinasas como FAK, ERK y PI3K (Chan *et al* 2009, Huyhn *et al* 2009, Quian *et al* 2005, Attoub *et al* 2000, Lin *et al* 2013), como hemos demostrado en el Capítulo I, la leptina induce TEM en MCF10A, y que esto depende de la activación de las cinasas FAK, ERK; en base a estos resultados evaluamos si la leptina promueve la invasión en células MCF10A, para lo cual mediante ensayos de invasión en cámaras Transwell realizamos tratamientos en presencia y ausencia de los inhibidores de FAK, ERK y PI3K. En la Figura 6 observamos que en presencia de leptina las células invadieron hacia la cámara inferior en comparación con las células no tratadas, y en presencia del inhibidor de FAK (PF-573228), disminuyó la invasión incluso por debajo de los niveles observados en el vehículo (células no tratadas). Evaluamos también estas condiciones en presencia del inhibidor de ERK (ERKI) y de PI3K (Wortmanina); en ambas condiciones observamos una disminución de la capacidad invasiva de; con estos ensayos podemos demostrar por primera vez que la leptina induce la TEM mediante la activación de FAK, ERK y PI3K-PDK1 en células epiteliales mamarias MCF10A.

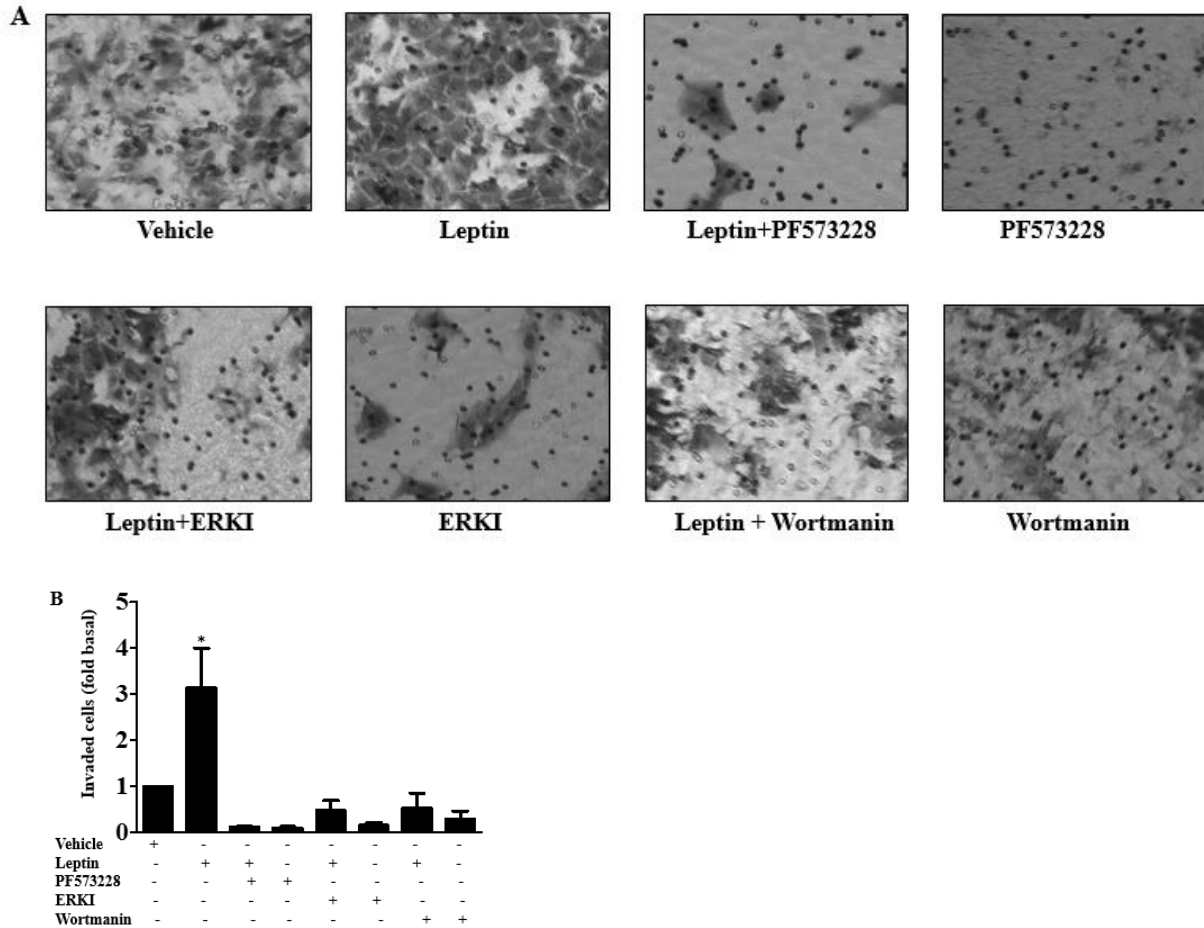


Figura 6. La leptina induce invasión celular a través de una vía dependiente de FAK, ERK y PI3K. Panel A. Las células MCF10A fueron puestas en la parte superior del inserto sobre el matrigel y tratadas en presencia (+) y ausencia (-) de leptina (400 ng/ml) y de inhibidor de ERK (30 Mm), FAK (10 Mm) y Wortmanina (10 000 Mm) por 48 h, las células que invadieron fueron contadas, las comparaciones se hicieron con los cultivos no estimulados. Panel B. La gráfica representa la media y desviación estándar de dos experimentos independientes por ANOVA de una vía. Significancia estadística $P < 0.05$.

Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la leptina como promotora de la TEM en células epiteliales mamarias MCF10A, este modelo puede emular lo que pudiera ocurrir *in vivo* durante el desarrollo de cáncer de mama en mujeres con hiperleptinemia. En el Capítulo I evaluamos el efecto de la leptina sobre la migración celular y de los marcadores clásicos de la TEM, en estos ensayos pudimos demostrar que el incremento en la migración celular fue dependiente de la dosis de leptina, este incremento estuvo acompañado de cambios morfológicos de tipo mesenquimal, de igual manera los niveles de vimentina incrementaron de manera proporcional a la dosis de leptina; en el caso de E-cadherina observamos una

disminución a las 3 h de tratamiento con 400 ng/ml de leptina, mientras que en los ensayos dosis de respuesta los niveles de E-cadherina no disminuyeron considerablemente, este comportamiento ha sido documentado en diversos reportes en donde algunos marcadores de la TEM como E-cadherina no disminuyen lo cual es propuesto como una 'Transición epitelio-mesénquima parcial' (Liu *et al* 2014, Hollestelle *et al* 2013, Grande *et al* 2015), esto es lo que pudiera estar ocurriendo en nuestro modelo. Otra posibilidad es que la proteína es relocalizada en citoplasma y el WB mide también la proteína en citoplasma; en este sentido, esto puede ser evidenciado al evaluar la localización subcelular de E-cadherina.

Por otro lado, demostramos que la leptina puede activar a cinasas citosólicas como FAK y ERK, y que la activación de estas cinasas es necesaria para la expresión de vimentina y para la migración celular, con los resultados concuerdan con reportes donde se ha evidenciado que estas cinasas favorecen la migración e invasión celular, debido a que promueve las contracciones de miosina y el movimiento del citoesqueleto celular (Gagliardi *et al* 2015 Taliaferro-Smith *et al* 2015, Wang *et al* 2013).

En el Capítulo II evaluamos una tercer la vía de señalización implicada en la TEM en respuesta a leptina, la vía P13K/PDK1 midiendo la fosforilación de PDK1 la cual presentó incremento de la fosforilación entre los 5 y 15 min de tratamiento con 400 ng/ml de leptina, posteriormente empleando a Wortmanina un inhibidor de PI3K evaluamos los niveles de expresión de vimentina, en estos ensayos pudimos demostrar que los niveles de vimentina, la migración y morfología celular dependen de la activación de PI3K. Otros marcadores de la TEM que también medimos fue la secreción de MMP-2 y MMP-9, en lo cuales observamos por ensayos de zimografía una mayor actividad catalítica de MMP-2 lo cual es indicativo de invasión celular, estos ensayos fueron complementados con ensayos de invasión en cámaras Transwell en donde en presencia de de leptina las células invadieron hacia la cámara inferior del inserto y en el control; mientras que en presencia de los inhibidores químicos de las cinasas FAK, ERK y PI3K no se observó invasión celular. Finalmente evaluamos al factor de transcripción Snail, en estos ensayos observamos que los niveles incrementan de manera proporcional al tiempo al utilizar la dosis de 400 ng/ml de leptina. Con estos resultados demostramos que la leptina promueve la TEM a través de la activación de FAK, ERK y PI3K/PDK1 en células MCF10A.

De acuerdo a los resultados obtenidos tenemos evidencia de la asociación que existe entre la obesidad y el desarrollo de cáncer de mama y que la liga entre ambos es la leptina la cual promueve la transición epitelio mesenquimal, favoreciendo que células de fenotipo epitelial se transdiferencien a un fenotipo maligno o tumoral, lo cual ya había sido demostrado en otras líneas celulares y en estudios epidemiológicos que asocian a la obesidad con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer, con nuestros resultados demostramos por primera vez que la leptina es inductora de la TEM en células MCF10A las cuales poseen características epiteliales de las células mamarias y este modelo proporciona evidencia de lo que puede suceder en mujeres con hiperleptinemia durante el inicio y progresión de cáncer de mama.

Por todo lo anterior hemos propuesto un modelo (Anexo 1) en el cual una vez unida la leptina al ObRb pueden ser activadas las vías de MAPK y PI3K/PDK1 las cuales tienen como proteínas blanco factores de transcripción como AP-1 y Ets que pueden activar genes para la transcripción de MMP-2 y MMP-9 favoreciendo la invasión celular; Snail puede activar a vimentina, la cual contribuye a la remodelación del citoesqueleto y favorece la migración celular. Además la leptina puede activar a FAK la cual es una cinasa citosólica no receptora, nuestra hipótesis es que la activación pudiera ser a través de Src o por un mecanismo de transactivación con el EGFR, al liberar Src ligando transmembranales del EGFR.

Referencias

- Ahn, J.H., Choi Y.S., Choi J.H. (2015). Leptin promotes human endometriotic cell migration and invasión by up-regulation MMP-2 through the JAK-2/STAT3 signaling pathway. *Mol Hum Reprod*, (10), pp.792-802.
- Attoub, S., Noe V., Pirola L., Bruyneel E., Chastre E., Mareel M., Wymann M.P. (2000). Gespach C. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, Rho-, and Rac-dependent signaling pathways. *FASEB*, (14) pp.2329-2338.
- Bai, X, Li P, Xie Y, Guo C, Sun Y, Xu Q, Zhao D. (2016). Overexpression of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 is associated with prognosis of gastric carcinoma. *Tumor Biol*, 37 (2) pp.2333-9.
- Batlle, E., Sancho E., Francí C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. *Nature Cell Biology*, (2) pp.84-89.
- Bilbao, M G, Di Yorio M P, Faletti A G (2011). Differential effects of leptin on ovarian metalloproteinases and their tissue inhibitors between in vivo and in vitro studies. *Journal of Endocrinology*, (2009) pp.65-74.

- Chan, K.T., Cortesio C.L., Huttenlocher A. (2009). FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *JBC*, 185 (2) pp. 357-370.
- Cheng, S P, Yin P H, Hsu Y C, Chang Y C, Huang S Y, Lee J J, Chi C W. (2011). Leptin enhances migration of human papillary thyroid cancer cells through the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. *Oncology Reports*, (26) pp.1265-71.
- Du, L, Chen X, Cao Y, Lu L, Zhang F, Bornstein S, Li Y, Owens P, Malkoski S, Said S, Jin F, Kulesz-Martin M, Gross N, Wang X. J., Lu S. L. (2006) Overexpression of PI3KCA in murine head and neck epithelium drives tumor invasion and metastasis through PDK1 and enhanced TGF β signaling. *Oncogene*, DOI 10.1038/onc.2016.1.
- Feng, H., Liu, Q., Zhang N., Zheng L., Sang M., Feng J., Zhang J., Wu X., Shan B. (2014). Leptin promotes metastasis by inducing an Epithelial-Mesenchymal Transition in A549 lung cancer cells. *Oncology Res*, (21) pp.165-171.
- Gagliardi, P.A., Di Blasio L., Somale D., Puliafito A., Chiaverina G., Bussolino F., Primo L. (2015). PDK1 regulates cell migration and 3D invasion of breast tumor cells by a kinase independent mechanism. *Cancer Res*, (75) (15 Suppl).
- Gilles, C, Polette M., Zahm J.M., Tournier J. M., Volders L., Foidart J.M., Birembaut P. (1999). Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci*, (112) pp.4615-25.
- Grande, M.T., Sánchez-Laorden B., López-Blau C., De Frutos C.A., Árevalo M., Rowe R.G., Weiss S.J. ET AL (2015). Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med*, 21(9) pp.989-97.
- Hollestelle, A., Peeters J. K., Smid M., Timmermans M., Verhoog L.C., Westened P.J., Heine A.A.J., ET AL (2013). Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. DOI 10.1007/s10549-013-2415-3.
- Huynh, N., Liu K. H., Baldwin G. S., He Hong. (2010). P21-activated kinase 1 stimulates colon cancer cell growth and migration/invasion via ERK-and AKT-dependent pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1803) pp. 1106-13.
- Iwatsuki, M., Momori K., Yokobori T., Ishi H., Beppu T., Nakamori S., Baba H., Mori M. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*, 101 (2) pp. 293-99.
- Jimenez, C., Armas P. R., Mellado M., Rodriguez-Frade J.M., Collard J., Serrano A., Martinez-A C. Avila J., Carrera A. C. (2000). Role of PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol*, (151) pp. 249-261.
- Kalluri, R. (2009). EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*, (119) pp. 11417-19.
- Kalluri, R., Weinberg R. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119 (6) pp. 1420-8.
- Kurrey, N.K., Jalgaonkar S.P., Joglekar A.V., Ghanate A. D., Chaskar P. D., Doiphode R. Y., Bapat S. A. (2009). Snail and Slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*, 27 (9) pp.2059-68.
- Li, Z, Shen J, Ka Kei Wu W, Yu X, Liang J, Qiu G, Liu J. (2012). Leptin induces cyclin D1 expression and proliferation of human nucleus pulposus cells via JAK/STAT, PI3K/Akt, and MEK/ERK pathways. *PLoS ONE*, 7(12):E53176.

Lin, M., Tsai S., Wang F., Liu F., Syu J., Tang F. (2013). Leptin induces cell invasion and the upregulation of matrilysin in human colon cancer cells. *Biomedicine*, (3) pp.174-180.

Liu, X., Huang H., Remmers N., Hollingsworth M. (2014). Loss of E-cadherin and epithelial to mesenchymal transition is not required for cell motility in tissues of for metastasis. *Tissue Barriers*, 2(4): DOI:10.4161/21688362.2014.969112

McInroy, L., Maatta A. (2007). Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesión. *Biochem Biophysical Res Comm*, 360 (1) pp.109-144.

Mendonsa, A M, Chalfant M C, Gorden L D, VanSaun M N. (2015). Modulation of the leptin receptor mediates tumor growth and migration of pancreatic cancer cells. *PloS One*, 10(4):e0126686.

Naber, H. P. H., Drabsch Y., Snaar-Jagalska B. E., Dijke P., Laar T. (2013). Snail and Slug, key regulators of TGF- β -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochem Biophys Res Comm*, 435 (1) pp. 58-63.

Nishioka, R., Itoh S., Gui T., Gai Z., Oikawa K., Kawai M., Tani M., Yamaue H., Muragaki Y. (2010). Snail induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metástasis ans invasiveness in vivo. *Exp Mol Pathol*, (89) pp. 149-157.

Qian, Y., Zhong X., Flynn D., Zheng J. Z., Qiao M., Wu C., Dedhar S., Shi X., Jiang B. (2005). ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene*, (24) pp.3154-65.

Saxena, N K, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, Anania F A. (2007). Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT and ERK signaling is involved in Leptin-Mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, (67) pp.2497-2507.

Schram, K, Ganguly R, No E K, Fang X, Thong F S, Sweeney G. (2011). Regulation of MT1-MMP and MMP2 by leptin in cardiac fibroblast involves Rho/ROCK-dependent-dependent actin cytoskeletal reorganization and leads to enhanced cell migration. *Endocrinology*, 152 (5) pp.2037-47.

Taliaferro-Smith, L., Oberlick E., Liu T., McGlothen T., Alcaide T., Tobin R., Donnelly S., Commander R., Kline E., Nagaraju G. P., Havel L., Marcus A., Nahta R., O'Regan R. (2015). FAK activation is required for IGF1R-mediated regulation of EMT, migration, and invasion in mesenchymal triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 6 (7) pp.4757-72.

Thorpe, L. M., Yuzugullu H., Zhao J.J., (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation ant therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*, 15 (1) pp.7-24.

Tseng Y, Yang C, Lin S, Cheng C, Lin S, Liu C, Chang K. (2011). Areca nut extract upregulates vimentin by activating PI3K/AKT signaling in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med*, (40) pp.160-166.

Uddin, S, Bavi P, Siraj A S, Ahmed M, Al-Rasheed M, Hussain A R. et al. (2010). Leptin-R and its association with PI3K/AKT signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine-Related Cancer*. *Cancer Res*, (67) pp.2497-2507.

Vega, S., Morales A. V., Ocaña O. H., Valdés F. Fabregat I., Nieto M. A. (2004). Snail block the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & Development*, (18) pp. 1131-1143.

Wang, D, Chen J, Chen H, Duan Z, Xu Q, Wei M, Wang L, Zhong M. (2011). Leptin regulates proliferation and apoptosis colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *J Biosci*, (37) pp.91-101.

Yan, D., Avtanski D., Saxena NJ., Sharma D., (2012) Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt protein-dependent pathways. *J Biol Chem*, (11) pp.8598-8612.

Yeh, W., Lu D., Lee M., Fu W. (2008). Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production. *GLIA*

Yokohama, K., Kamata N., Fujimoto R., Tsutsumi S., Tomonari M., Taki M., Hosokawa H., Nagayama M. (2003). Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J of Oncology*, (22) pp. 891-898.

Anexos

Anexo 1

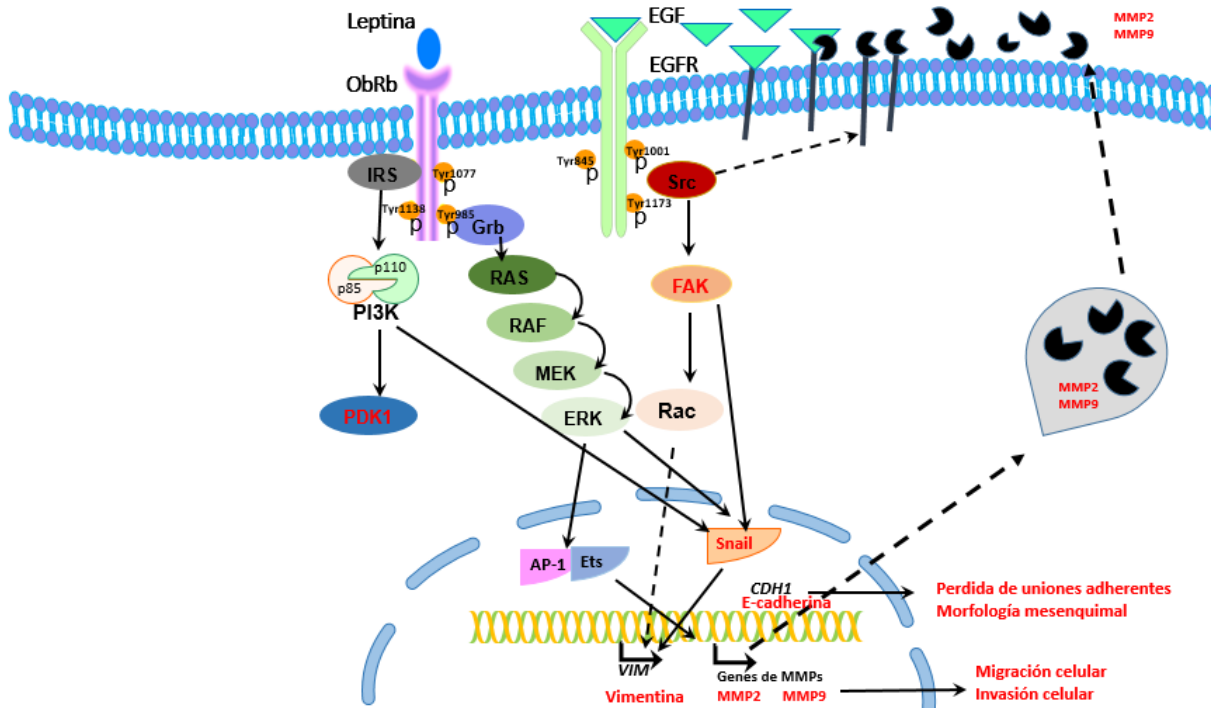


Figura 1. Modelo hipotético de la Transición epitelio-mesénquima en respuesta a leptina. Una vez unida la leptina al ObRb pueden ser activadas las vías de MAPK y PI3K/PDK1 las cuales tienen como proteínas blanco factores de transcripción como AP-1 y Ets que pueden activar genes para la transcripción de MMP-2 y MMP-9 favoreciendo la invasión celular; Snail puede activar a vimentina, la cual contribuye a la remodelación del citoesqueleto y favorece la migración celular. Además la leptina puede activar a FAK la cual es una quinasas citosólica no receptora, nuestra hipótesis es que la activación pudiera ser a través de Src o por un mecanismo de transactivación con el EGFR, al liberar Src ligando transmembranales del EGFR.