

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA-UIEM**



MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“Participación de PI3K y Rac1 en la Transición Epitelio-Mesenquimal inducida por leptina en células MCF10A”

T E S I S

**Para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Biomédicas**

P R E S E N T A:

Q.B.P. OSCAR EDUARDO DURAN GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EDUARDO CASTAÑEDA SAUCEDO

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. NAPOLEÓN NAVARRO TITO

Chilpancingo, Guerrero. Junio de 2016

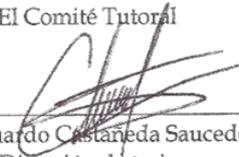


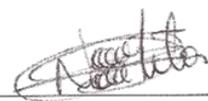
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 21 días del mes de enero de dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Participación de PI3K y Rac1 en la transición epitelio mesenquimal inducido por leptina en células MCF10A", presentada por el alumno Oscar Eduardo Durán González, para obtener el Grado de Maestría 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.

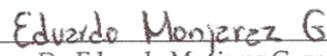
El Comité Tutorial


Dr. Eduardo Castañeda Saucedo
Dirección de tesis


Dr. Napoleón Navarro Tito
Codirector de tesis


Dra. Gloria Fernández Tilapa


Dr. Alejandro Millán Vega


Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán

Vo. Bo


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Unidad
Académica de Ciencias Químico Biológicas
Posgrado UACQB


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UACQB
DIRECCIÓN 2017-2018
Dra. Amalia Venegas Velázquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección del Dr. Eduardo Castañeda Saucedo y la co-dirección del Dr. Napoleón Navarro Tito

Y con la asesoría de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán

Dr. Alejandro Millán Vega

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por el presente de seguir viviendo, por todas sus bendiciones, por no dejarme solo y darme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente.

Al Dr. Eduardo Castañeda Saucedo por haberme brindado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, su tiempo invertido y la asesoría a este trabajo. Gracias Dr. por su apoyo moral y académico, y sobre todo por su amistad y confianza. Le deseo mucho éxito en sus futuros proyectos.

Al Dr. Napoleón Navarro Tito por la asesoría (con esos ejemplos inigualables☺), disposición en ayudarme, tiempo invertido y sugerencias para la culminación de este proyecto. Gracias por el gran apoyo, confianza y amistad sincera. Le deseo mucho éxito en sus proyectos. Gracias totales.

A la Dra. Gloria Fernández Tilapa por su apoyo, atención, tiempo dedicado y sugerencias a este proyecto.

Al Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán por su disponibilidad, sugerencias y tiempo invertido a este proyecto.

Al Dr. Alejandro Millán Vega por sus sugerencias, apoyo y tiempo dedicado.

A todos mis amigos del Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, por todo su apoyo durante la elaboración de este proyecto, en especial a Dra. Meche por su gran ayuda, orientación y amistad sincera. A las chicasaurias (Karem y Betty) por su apoyo y amistad, voy a extrañar echar relajo con ustedes☺, mucho éxito y gracias totales. A JK por la ayuda aportada y amistad, a ver cuándo ese album☺. A Cire BeRi por tu gran amistad, Okia. Al Valfredo por los momentos amenos, obviously. Miriam y Dena, gracias por su apoyo en la organización del laboratorio y por su amistad. Chicas Rac1... Paty, Fany, Isamar y Angélica, gracias por su ayuda y amistad, son divertidas y locas☺. Las bastantas (Magda y Chela), Lore, Puyol, y mis estimados y queridos cadmios (Lili, Ana y Héctor) gracias totales. A todos los del LBCC, gracias por haber hecho cada día distinto y no caer en la rutina. Por favor, pero... por favor, no pierdan las bonitas costumbres. ¿Caribes? ☺. GRACIAAS TOTALES

Dedicatorias

A mis papas, Isidora y Maximino, con todo mi cariño y amor, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por sus consejos y apoyo incondicional. Gracias a dios y a ustedes he llegado a donde estoy, los amo. ¡Lo logramos!

A mis hermanos Brenda, José y Ceci, por estar conmigo en todo momento, por echarme porras y demostrarme su apoyo incondicional. Gracias por los momentos de felicidad y travesuras. Cuentan conmigo hermanos, los amo. Animo hermano tu puedes.

A mi abuelita Eligia, Tío Nías y toda mi familia por su cariño y apoyo, los quiero mucho.

A mi novia Marisol, por apoyarme de principio a fin en este proyecto. Te dedico este trabajo con todo mi cariño y amor. Gracias por tu paciencia, apoyo y tus palabras de esperanza. Huum huum, te amo.

A mis queridos amigos Shirley, Zitlali, Yaneli, Bris, Jake (,), Xóchitl e Irving (cacatuospower), gracias por su apoyo, los quiero mucho.

Participación de PI3K y Rac1 en la Transición Epitelio-Mesenquimal inducida por leptina en células MCF10A

Índice

Abstract	1
Resumen	2
Introducción	3
Material y Métodos	5
<i>Reactivos</i>	5
<i>Elaboración de perlas GST-PAK</i>	5
<i>Cultivo celular</i>	6
<i>Ensayos de inhibición de Rac1 y PI3K</i>	6
<i>Ensayos de curso temporal</i>	6
<i>Ensayos de Pull down</i>	7
<i>Ensayos de Western blot</i>	7
<i>Ensayos de cierre de herida</i>	8
<i>Análisis estadístico</i>	8
Resultados	8
<i>La leptina induce un incremento en la fosforilación de AKT y la activación de Rac1 en células MCF10A</i>	8
<i>La leptina disminuye la expresión de E-cadherina e incrementa la expresión de vimentina en células MCF10A</i>	9
<i>Efectos de la inhibición de Rac1 en la expresión de E-cadherina y vimentina inducido por leptina</i>	9
<i>La cinasa PI3K y la GTPasa Rac1 participan en la migración de células MCF10A en respuesta a leptina</i>	10
Discusión	14
Referencias	18

Participación de PI3K y Rac1 en la Transición Epitelio-Mesenquimal inducida por leptina en células MCF10A

Oscar Eduardo Durán González¹, Eduardo Castañeda Saucedo*¹, Napoleón Navarro Tito¹, Gloria Fernández Tilapa, Eduardo Monjaraz Guzmán, Alejandro Millán Vega.

*Autor de correspondencia.¹Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, UACQB, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas S/N Ciudad Universitaria, C.P. 39090 Chilpancingo, Guerrero, México.

Abstract

Introduction. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is associated with the acquisition of pro-metastatic properties in breast cancer cells. Deregulation in the production of adipocytokines, particularly overproduction of leptin, has been associated with the progression of breast cancer. Leptin induces the activation of signaling molecules such as PI3K/AKT and the GTPase Rac1, which are implicated in EMT. However, the role of leptin in EMT in breast epithelia, is still unclear.

Objective. In the present study, we evaluated the participation of PI3K/AKT and the GTPase Rac1 in leptin-induced EMT in the non-tumorigenic breast epithelial cell line MCF10A. **Material and Methods.** MCF10A cells were treated with human recombinant leptin in the presence or not of PI3K or Rac1 inhibitors. The expression of E-cadherin and vimentin, and AKT phosphorylation were determined by Western blot. The levels of active Rac1 were determined by pull down assays. Cell migration was evaluated by wound-healing assay. **Results.** Leptin induces phosphorylation of AKT and the activation of Rac1 in MCF10A cells. Leptin treatment caused a decrease in the expression of E-cadherin and an increase in vimentin expression. Pharmacological inhibition of PI3K, reduces the effect of leptin on vimentin expression, but had no effect on E-cadherin expression. Chemical inhibition of Rac1 caused a decrease in E-cadherin expression. Migration of MCF10A cells in responses to leptin was reduced in the presence of chemical inhibitors of both PI3K or Rac1. **Conclusion.** Leptin promotes EMT through PI3K and Rac1 in cells MCF10A.

Resumen

Introducción. La Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) es un proceso biológico asociado con la adquisición de propiedades pro-metastásicas en cáncer de mama. La desregulación en la producción de adipocitocinas, particularmente la sobreproducción de leptina, ha sido asociada con la progresión del cáncer de mama. La leptina induce la activación de la vía PI3K/AKT y la GTPasa Rac1, las cuales están implicadas en la TEM. Sin embargo, el papel de la leptina en TEM en epitelio de mama, todavía no está claro. **Objetivo.** En el presente estudio, se evaluó la participación de PI3K/AKT y de la GTPasa Rac1, en la TEM inducida por leptina, en la línea celular de epitelio de mama no tumorigénica MCF10A. **Material y métodos.** Células MCF10A fueron tratadas con leptina recombinante humana. La fosforilación de AKT y la expresión de E-cadherina y vimentina, fueron determinadas por Western blot. Los niveles de Rac1 activo fueron determinados por ensayos de Pull down. La migración celular fue evaluada por ensayos de cierre de herida. **Resultados.** La leptina induce la fosforilación de AKT y la activación de Rac1 en células MCF10A. El tratamiento con leptina provoca una disminución en la expresión de E-cadherina y un aumento en la expresión de vimentina. La inhibición farmacológica de PI3K, bloquea la expresión de vimentina estimulada por leptina, pero no tiene efecto sobre la expresión de E-cadherina. La inhibición química de Rac1 causa una disminución en la expresión de E-cadherina. La migración de células MCF10A en respuesta a leptina disminuyó en presencia de los inhibidores químicos de PI3K y Rac1. **Conclusión.** La leptina promueve TEM a través de PI3K y Rac1 en células MCF10A.

Introducción

La Transición Eitelio-Mesenquimal (TEM) es un proceso biológico a través del cual las células eiteliales adquieren características mesenquimales, incrementando su capacidad migratoria e invasiva (Lamouille et al., 2014, Micalizzi et al., 2010). Durante la TEM, hay pérdida de la expresión de marcadores eiteliales como E-cadherina, proteínas de uniones estrechas y citoqueratinas. Al mismo tiempo hay un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales, tales como vimentina, fibronectina, proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1), α -actina de músculo liso (α -SMA), y N-cadherina (Gonzalez and Medici, 2015, Micalizzi et al., 2010). Existen factores de transcripción que promueven el proceso de TEM, entre ellos, ZEB1, Snail1, Snail2 (Slug), E47 y Twist, los cuales se unen directamente a la secuencia E-box del promotor del gen de E-cadherina (*CDH1*), reprimiendo su expresión (Cubillo et al., 2013, Mazda et al., 2011, Villarejo et al., 2014, Casas et al., 2011). Por otro lado, el promotor del gen de vimentina (*VIM*), posee sitios de unión para β -catenina/TCF, NF- κ B, AP-1, PEA3, Sp/XKLF, ZPB-89, y SIP1, factores que promueven la transcripción del gen de vimentina (Arun Satelli, 2011, Bindels et al., 2006, Liu et al., 2014). El incremento en los niveles de expresión de vimentina y la disminución de E-cadherina, han sido considerados como los marcadores canónicos de la TEM (Zeisberg, 2009).

Recientemente, se ha propuesto a la leptina como inductor de la TEM en células A549 y MCF7 (Feng et al., 2014, Yan et al., 2012). La leptina es codificada por el gen *OB*, es un polipéptido de 16 kDa, secretado principalmente por adipocitos y cuya función primaria es regular el apetito y el gasto energético a través de la estimulación del sistema nervioso central (Vansaun, 2013). Sin embargo, se ha descrito que la leptina está involucrada en la tumorigénesis, especialmente en el desarrollo y progresión del cáncer de mama (Newman and Gonzalez-Perez, 2014, Surmacz, 2007). En este contexto, la leptina y su receptor (Ob-R) se han encontrado sobreexpresados en tumores malignos de mama, en comparación con tejido normal o tumores benignos (Garofalo et al., 2006). La sobreexpresión de la leptina, como de su receptor en las células tumorales mamarias, sugiere que la leptina promueve el potencial maligno de estas células de manera localizada. Dentro de las vías de señalización que son activadas por la leptina están las vías de JAK/STAT, ERK1/2, y PI3K/AKT (Penicaud et al., 2012, Vansaun, 2013, Zhou

and Rui, 2013). Además, las cinasas PI3K y ERK1/2 inducen la actividad de la pequeña GTPasa Rac1, la cual está implicada en migración e invasión celular, dos eventos biológicos que son el resultado de un proceso de TEM (Du et al., 2011, Tong et al., 2013). De manera particular, la vía de PI3K/AKT, participa en el proceso de TEM inducido por factores como TGF- β , Jagged y Wnt, regulando los niveles de expresión de E-cadherina, vimentina y fibronectina (Bakin et al., 2000, Veeraraghavalu, 2005, Grille et al., 2003). Rac1 participa en el proceso de TEM inducido por factores como TGF- β , colágeno de tipo 1 y humo de tabaco, regulando la expresión de Snail, y marcadores de TEM (Santibanez et al., 2010, Shen et al., 2014, Shintani et al., 2006). La actividad de Rac1 puede ser favorecida por el factor de transcripción Twist, el cual puede promover la transcripción del co-activador NED99 y el GEF DOCK3 de Rac1 (Yang et al., 2012). A través de sus efectores, Rac1 promueve el proceso de TEM, por ejemplo, el efector IQGAP interactúa con β -catenina, reduciendo las uniones célula-célula mediadas por E-cadherina (Hage et al., 2009). También la activación de la cinasa PAK por Rac1, induce la fosforilación del residuo Ser38 de vimentina, promoviendo la formación de lamelipodios (Helfand et al., 2011).

Los mecanismos mediante los cuales la leptina induce TEM en células de cáncer de mama no son claros. En un estudio reciente, utilizando líneas celulares de cáncer de mama se demostró que la leptina aumenta la acumulación nuclear de β -catenina, por la fosforilación de GSK3- β vía AKT o por la acumulación de Wnt1, lo que conlleva a una disminución en la expresión de E-cadherina y un aumento de vimentina (Yan et al., 2012). Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo utilizando la línea celular de epitelio de mama no tumoral MCF10A, la cual expresa la isoforma larga del receptor a leptina (OB-Rb)(Yom et al., 2013), determinaron que el tratamiento con leptina promueve un aumento en la migración celular, secreción de metaloproteasas de matriz y niveles altos de vimentina. Sin embargo, aún no se tiene claro cuáles son los mecanismos por los cuales la leptina modifica los niveles de expresión de estas proteínas. En este estudio evaluamos la participación de la cinasa PI3K y la GTPasa Rac1 en la TEM inducida por la leptina en células MCF10A.

Material y métodos

Reactivos

Los anticuerpos: anti-Rac1 (05-389), anti-tubulina (05-829), y anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo, fueron adquiridos de Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, U.S.A). El inhibidor de Rac1, NSC23766, y los anticuerpos Anti-Vimentina (sc-6260), anti-E-cadherina (sc-21791) y Anti-AKT fosfo-Ser473 (sc-7985-R), fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, U.S.A). El anticuerpo anti-AKT-T (P2482), Trizma, KODAK BioMax Light Film, leptina recombinante humana, wortmanina, medio DMEM F12, Hidrocortisona, IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), fueron compradas de Sigma Aldrich (St.Louis, Missouri, U.S.A). El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido de BYPRODUCTOS (Guadalajara, México). El antibiótico/antimicótico es procedente de Gibco, Life Technologies (California, U.S.A). El Tritón X-100 y Kit ECL –Western blotting, fueron comprados en Bio-Rad (California, U.S.A).

Elaboración de perlas GST-PAK

Las bacterias de *Escherichia coli* BL21, transformadas con la construcción GST-PAK (proporcionadas por el Dr. José Vázquez Prado, CINVESTAV), fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) adicionado con 50 μ g/mL de ampicilina a 37°C, en agitación constante, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. La expresión de la proteína recombinante fue inducida mediante la adición de 0.2 mM de IPTG por toda la noche a 37°C, en agitación constante. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación y resuspendidas en buffer de lisis (PBS 1X-Tritón X-100 1%, EDTA 1mM, PMSF 1mM, Leupeptina μ g/ml, aprotinina μ g/ml) y sometidas a 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento. Los lisados fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue incubado con perlas Glutación S-Transferasa por 1 h a 4°C, en agitación constante. La proteína recombinante unida a las perlas, fue lavada tres veces con buffer de lisis e inhibidores. Por último, la cantidad de proteína recombinante unida a las perlas glutación sefarosa, fue estimada usando geles SDS teñidos con azul de Coomassie.

Cultivo Celular

La línea celular de epitelio de mama no tumoral, MCF10A, fue mantenida en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico/antimicótico, 10 µg/mL de insulina, 0.5 µg/mL de hidrocortisona, 20 ng/mL de EGF, en una atmósfera de 5% de CO₂ y a 37°C.

Ensayos de inhibición de Rac1 y PI3K

Inhibición de Rac1. Las células MCF10A a una confluencia del 100%, fueron suprimidas de suero e incubadas con 25 µM del inhibidor de Rac1 (NSC23766) por 4 h. Se realizó una rayadura con una punta amarilla estéril. Posteriormente los cultivos se trataron con 400 ng/mL de leptina por 24 h. Concluido el tratamiento se obtuvieron proteínas totales. La cantidad de 30 µg de proteínas totales fueron analizadas por Western blot con anticuerpo primario para E-cadherina y vimentina.

Inhibición de PI3K. Cultivos celulares MCF10A a una confluencia del 100%, fueron suprimidas de suero por 4 h. Posteriormente se trataron con 20 nM de wortmanina, 2 h antes de culminar la supresión de suero. Después se realizó una rayadura con una punta amarilla estéril. Los cultivos celulares se trataron con 400 ng/mL de leptina por 24 h. Terminado el tratamiento se obtuvieron proteínas totales. La cantidad de 30 µg de proteínas totales fueron analizadas por Western blot usando anticuerpo primario para E-cadherina y vimentina.

Ensayos de curso temporal

Las células MCF10A fueron crecidas hasta alcanzar la confluencia del 80%. Antes de cada ensayo se pusieron en supresión de suero por 4 h. Después, las células fueron tratadas en medio DMEM libre de suero en presencia de 400 ng/mL de leptina durante 5, 10, 15, 30 y 60 min. Se hizo la obtención de proteínas totales con 1 mL de buffer de lisis RIPA (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 100 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, glicerol 10%, Tritón X100 1%, desoxicolato de sodio 1%, MgCl₂ 1.5 mM, PMSF 1 mM). Para evaluar la fosforilación de AKT se usaron 30 µg de proteínas totales, las cuales fueron analizadas por Western blot con anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-Ser473 AKT, la membrana fue reincubada con anticuerpo monoclonal de ratón anti-AKT.

Ensayos de Pull down

Las células MCF10A fueron crecidas hasta alcanzar la confluencia del 80%. Antes de cada ensayo se pusieron en supresión de suero por 4 h. Posteriormente se trataron con 400 ng/mL de leptina por distintos tiempos. Después del tratamiento se hizo la obtención de proteínas totales con 1 mL de buffer de lisis (Tritón X-100 1%, Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 0.3 M, MgCl₂ 10 mM y PMSF 1 mM), se colectó el lisado celular y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteínas totales fue determinada usando un espectrofotómetro, Nanodrop ND-2000. Rac1 activo fue aislado de un miligramo de proteína total, que fue incubado con perlas de glutatión S-transferasa (GST)-PAK (Rac1), por una hora a 4°C. El producto de la interacción fue centrifugado a 12000 rpm por 5 min, el botón obtenido se lavó tres veces con buffer de lisis y por último re-suspendido en buffer de muestra 2X. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa, el inmunoblot se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-Rac1.

Ensayos de Western blot

Las proteínas fueron extraídas con RIPA (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 100 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, glicerol 10%, Tritón X100 1%, desoxicolato de sodio 1%, MgCl₂ 1.5 mM, PMSF 1 mM). Los extractos fueron centrifugados a 12000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante fue colectado. La concentración de proteínas fue determinada usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000. Los extractos proteicos fueron separados en geles de poliacrilamida al 10% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche al 5% en TBS-T por 2 h a temperatura ambiente. La membrana fue incubada, ya sea con anticuerpo monoclonal de ratón contra vimentina o anticuerpo monoclonal de ratón contra E-cadherina, por toda la noche a 4°C. Se hicieron 3 lavados a la membrana con TBS-T al 0.05%. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante por 2 h, nuevamente la membrana fue lavada 3 veces con TBS-T 0.05%. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el kit ECL –Western blotting. Las bandas inmunoreactivas fueron

detectadas en placas autoradiográficas. Se realizó el análisis densitométrico a las bandas del inmublot utilizando el programa ImageJ.

Ensayo de cierre de herida

Las células MCF10A fueron crecidas en placas de cultivo celular de 60 mm, hasta que alcanzaron la confluencia del 100%, fueron mantenidas por 4 h en supresión de suero, posteriormente se incubaron con Ara C durante 2 h, con el fin de inhibir la proliferación celular. A la monocapa de células se les hizo una rayadura con una punta amarilla de pipeta estéril de 200 μ L, después se lavaron con PBS para remover las células despegadas. Posteriormente las células se trataron con leptina y/o los inhibidores de PI3K y Rac1. A las 48 h de tratamiento, con ayuda de un microscopio invertido Olympus, usando el objetivo 10X, se tomaron 5 fotografías a lo largo del cierre de la herida de cada condición. La migración celular se evaluó realizando cinco mediciones aleatoriamente a lo largo del cierre de la herida en cada imagen, usando el programa ImageJ 1.32. Se obtuvo la media de las cinco mediciones. Para calcular el porcentaje de área abierta de la herida, se utilizó la siguiente fórmula: % área abierta = $A \times 100 / B$, donde A = media con tratamiento y B = media sin tratamiento.

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA y prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6.0. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si $*P < 0.05$.

Resultados

La leptina induce un incremento en la fosforilación de AKT y la activación de Rac1 en células MCF10A

Para demostrar si la leptina puede inducir la activación de la vía PI3K/AKT y la GTPasa Rac1 en las células MCF10A, se realizaron ensayos de curso temporal. Las células MCF10A fueron estimuladas con 400 ng/mL de leptina por diferentes intervalos de tiempo. La actividad de la vía de PI3K/AKT se evaluó indirectamente a través de la fosforilación de AKT. Los niveles de fosforilación de AKT fueron determinados mediante Western blot con anticuerpo anti-AKT fosfo-Ser473. Como

se muestra en la Figura 1, la leptina induce la fosforilación de AKT a los 5 min de tratamiento, manteniéndose la fosforilación hasta los 60 min. La membrana fue reincubado con anticuerpo AKT-T, como control de carga. Por otra parte, la actividad de Rac1 fue determinada mediante ensayos de Pull-down y Western blot. En la Figura 2, se observa que la leptina incrementa la actividad de Rac1 a los 5 min de tratamiento, decayendo esta actividad a los 10 min, y volviendo a aumentar a los 30 y 60 min. El tratamiento con leptina no tiene efecto en los niveles de expresión de Rac1.

La leptina disminuye la expresión de E-cadherina e incrementa la expresión de vimentina en células MCF10A

El tratamiento con 400 ng/mL de leptina provoca la disminución en la expresión del marcador epitelial E-cadherina (Figura 3A) y un incremento en la expresión del marcador mesenquimal vimentina en células MCF10A (Figura 3B). Con el fin de aclarar los posibles mecanismos por los cuales la leptina modula la expresión de E-cadherina y vimentina en células MCF10A. Las células MCF10A fueron tratadas con leptina y wortmanina, un inhibidor de PI3K. En la Figura 3B, observamos que el tratamiento con wortmanina, reduce la sobreexpresión de vimentina inducida por leptina. No obstante, el tratamiento con el inhibidor de PI3K, reduce aún más los niveles de expresión de E-cadherina en comparación con el tratamiento con leptina (Figura 3A).

Efectos de la inhibición de Rac1 en la expresión de E-cadherina y vimentina inducida por leptina

Previamente demostramos que la leptina aumenta la actividad de Rac1 en células MCF10A. Diferentes estudios han reportado que la GTPasa Rac1 puede modular la expresión de marcadores de TEM, favoreciendo este proceso. En nuestro modelo de estudio, la inhibición química de Rac1 con NSC23766, resultó inesperadamente, en una mayor disminución en la expresión de E-cadherina, en relación a la observada con el tratamiento con leptina (Figura 4A). En el caso de vimentina, la inhibición de Rac1, reduce la sobreexpresión de vimentina inducida por leptina. Es importante notar, que el tratamiento solo con el inhibidor de Rac1 aumenta la expresión de vimentina (Figura 4B).

La cinasa PI3K y la GTPasa Rac1 participan en la migración de células MCF10A en respuesta a leptina

En las Figuras 5 y 6, se muestra que el tratamiento con leptina aumenta la migración de las células MCF10A. En distintos estudios se ha descrito la participación de la vía PI3K/AKT y la GTPasa Rac1 en el proceso de migración celular. Con el fin de determinar si la migración de las células MCF10A en respuesta a leptina depende de la activación de la vía PI3K/AKT y la GTPasa Rac1, se realizaron ensayos de cierre de herida, en presencia de wortmanina y NSC23766. La inhibición química de PI3K, reduce totalmente la migración celular inducida por leptina en células MCF10A (Figura 5). De manera similar, el pretratamiento con el inhibidor químico de Rac1, disminuye la migración de las células MCF10A estimuladas con leptina. Inesperadamente el tratamiento solo con el inhibidor de Rac1, promueve la migración celular (Figura 6).

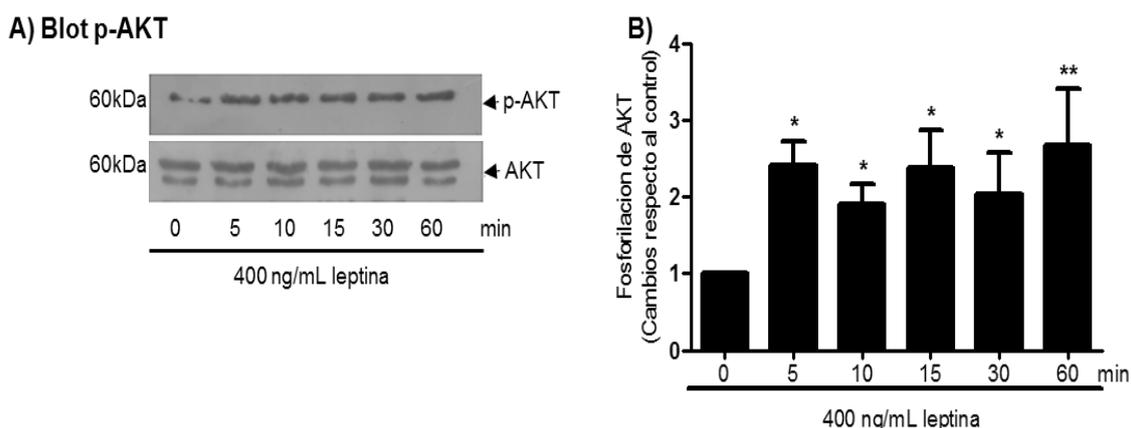


Figura 1. La leptina induce la fosforilación de AKT en la línea celular MCF10A. Las células MCF10A fueron tratadas con 400 ng/mL de leptina por distintos intervalos de tiempo. A) Los lisados proteicos totales, fueron analizados por Western blot, usando un anticuerpo específico para fosfo-Ser473-AKT. La membrana fue re-incubada con anticuerpo para AKT total, como control de carga. B) La gráfica representa la cantidad relativa de p-AKT determinada por el análisis densitométrico de las bandas del inmunoblot, comparadas con AKT-T, de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, mediante la prueba de Newman Keuls.

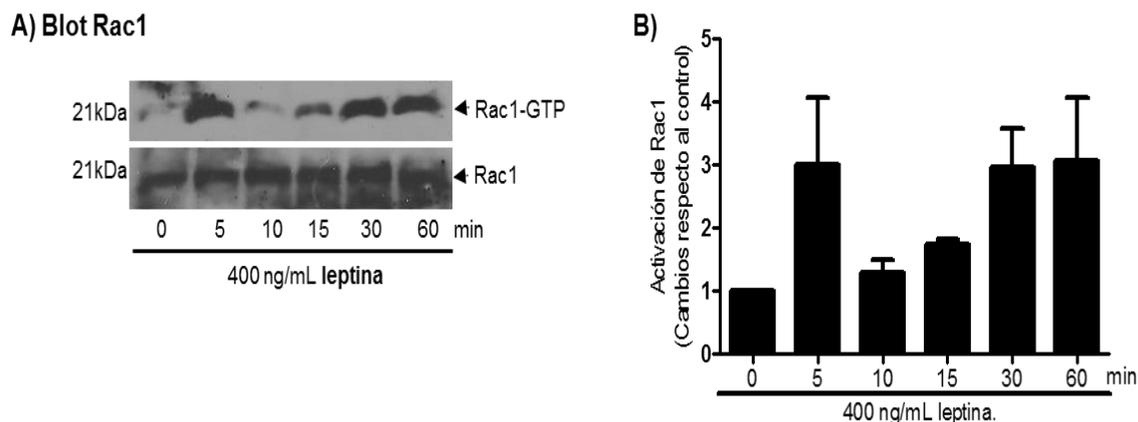


Figura 2. La leptina induce la activación de Rac1 en células MCF10A. La línea celular MCF10A fue tratada con 400 ng/mL de leptina por diferentes tiempos. La forma activa de Rac1 (Rac1-GTP) fue detectada mediante ensayos de Pull down y Western blot. A) imagen representativa del ensayo de Pull down de Rac1. B) La gráfica de la derecha representa la cantidad relativa de Rac1 activo, determinada por el análisis densitométrico de las bandas obtenidas del inmunoblot de dos ensayos independientes. No hubo diferencias estadísticamente significativa, valor obtenido de $P > 0.05$, por Newman Keuls.

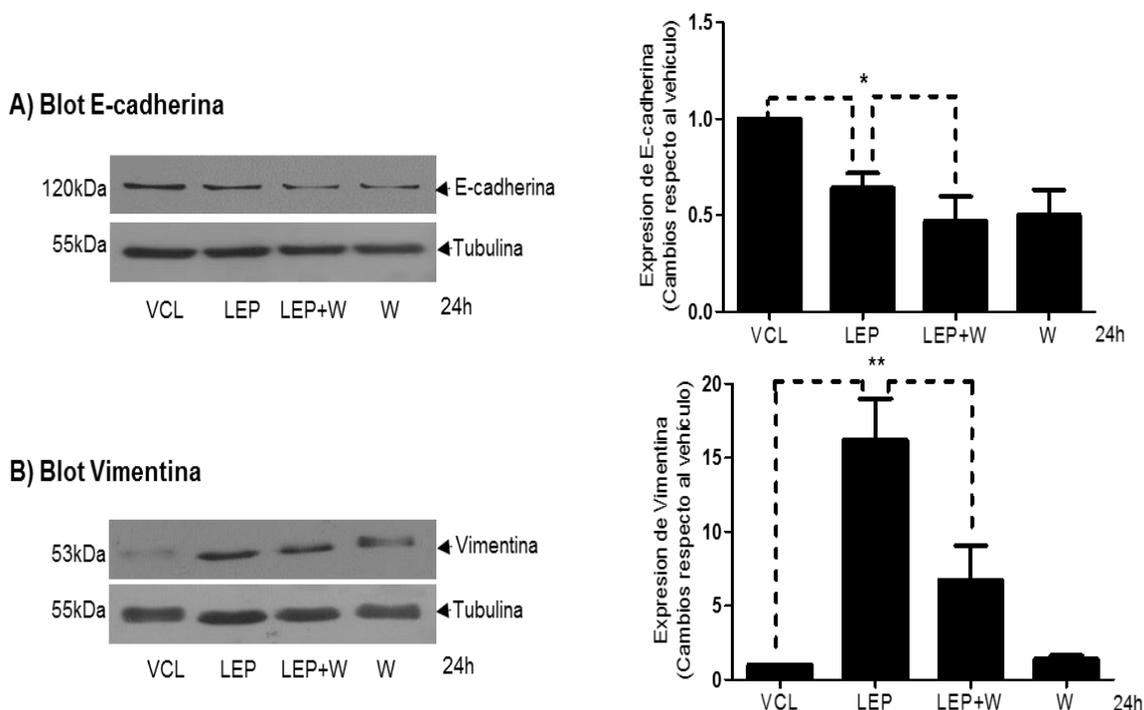


Figura 3. La leptina a través de PI3K regula la expresión de vimentina y no de E-cadherina, en células MCF10A. Los cultivos de células MCF10A, fueron tratados con: vehículo: Tris-HCL 10 mM pH 8.5 (VCL). 400 ng/mL leptina (LEP). 400 ng/mL leptina + 20 nM de wortmanina (LEP+W) y 20 nM de wortmanina (W). Panel izquierdo. Imágenes representativas de los inmunoblot de E-cadherina (A) y vimentina (B). Las membranas

fueron reincubadas con anticuerpo para tubulina, como control de carga. Panel derecho. Representación gráfica del análisis densitométrico y estadístico de las bandas de los inmunoblots de E-cadherina y vimentina, normalizado a tubulina, de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, prueba de Newman Keuls.

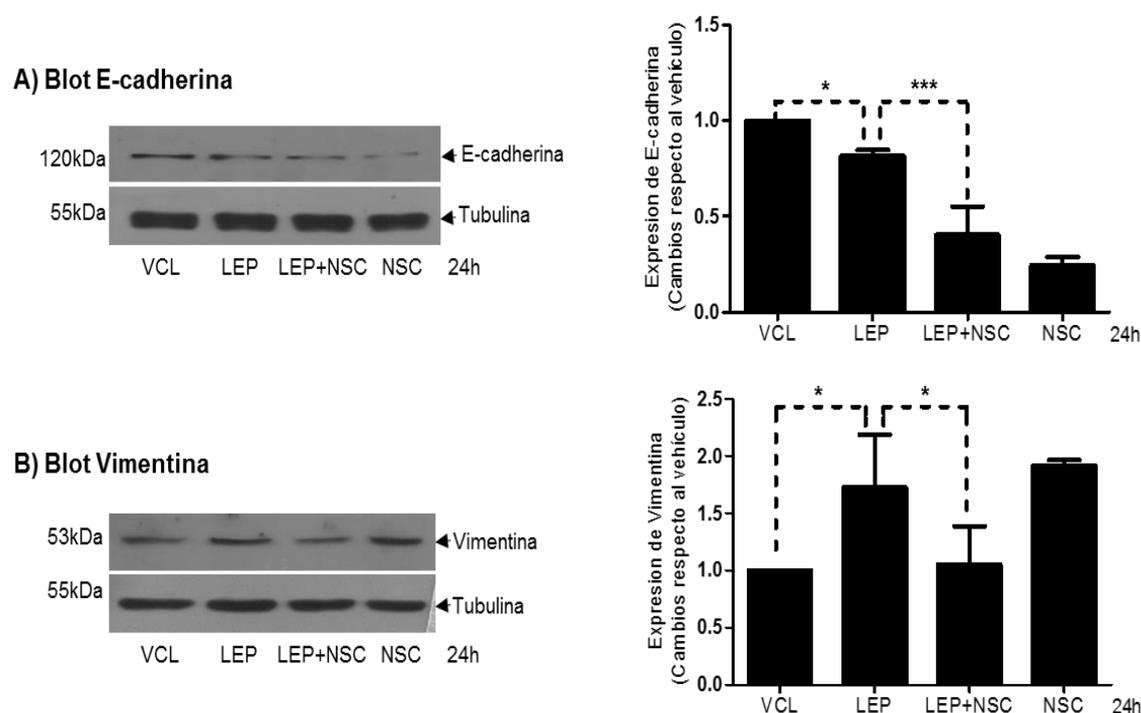


Figura 4. Efecto de la inhibición de Rac1 en la expresión de E-cadherina y vimentina inducida por leptina. Las células MCF10A, fueron tratadas con las condiciones: Vehículo: Tris-HCL 10 mM pH 8.5 (VCL). 400 ng/mL leptina (LEP). 400 ng/mL leptina + 25 μ M NSC23766 (LEP+NSC) y 25 μ M NSC23766 (NSC). Las imágenes de la izquierda representan los inmunoblots de la expresión de E-cadherina (A) y vimentina (B). Las membranas se re-incubaron con anticuerpo para tubulina como control de carga. Los histogramas de la derecha representan el análisis densitométrico y estadístico de las bandas obtenidas de los inmunoblots de E-cadherina y vimentina, de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, prueba de Newman Keuls.

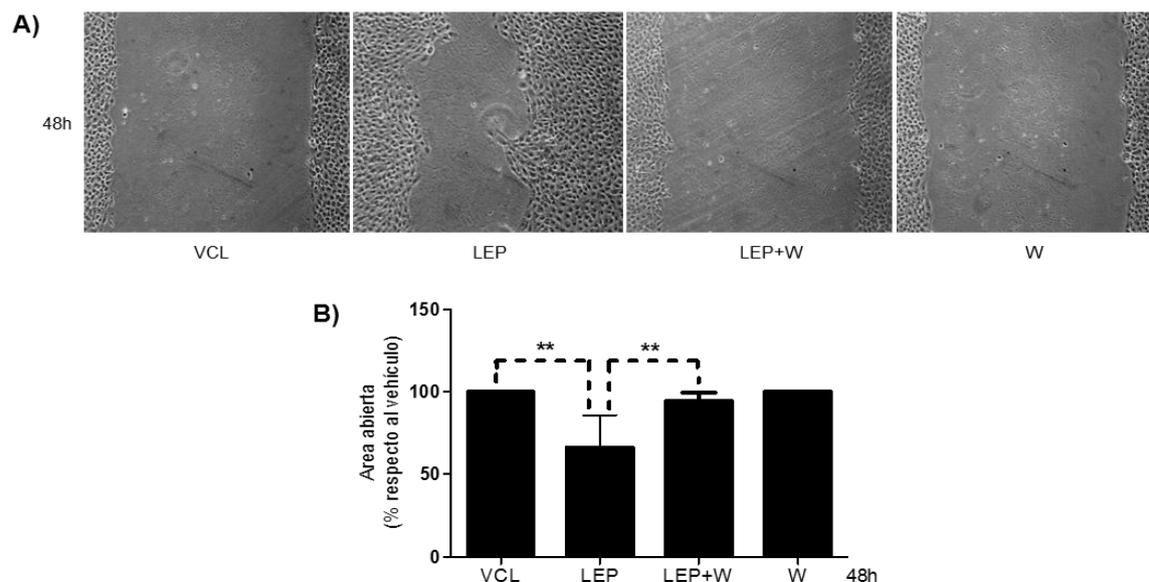


Figura 5. La leptina induce migración celular a través de PI3K. A) imágenes representativas de tres ensayos de cierre de herida en células MCF10A. B) La gráfica representa el porcentaje de área abierta de la herida con respecto al control, de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, prueba de Newman Keuls. Vehículo: Tris-HCL 10 mM pH 8.5 (VCL). 400 ng/mL leptina (LEP). 400 ng/mL leptina + 20 nM de wortmanina (LEP+W) y 20 nM de wortmanina (W).

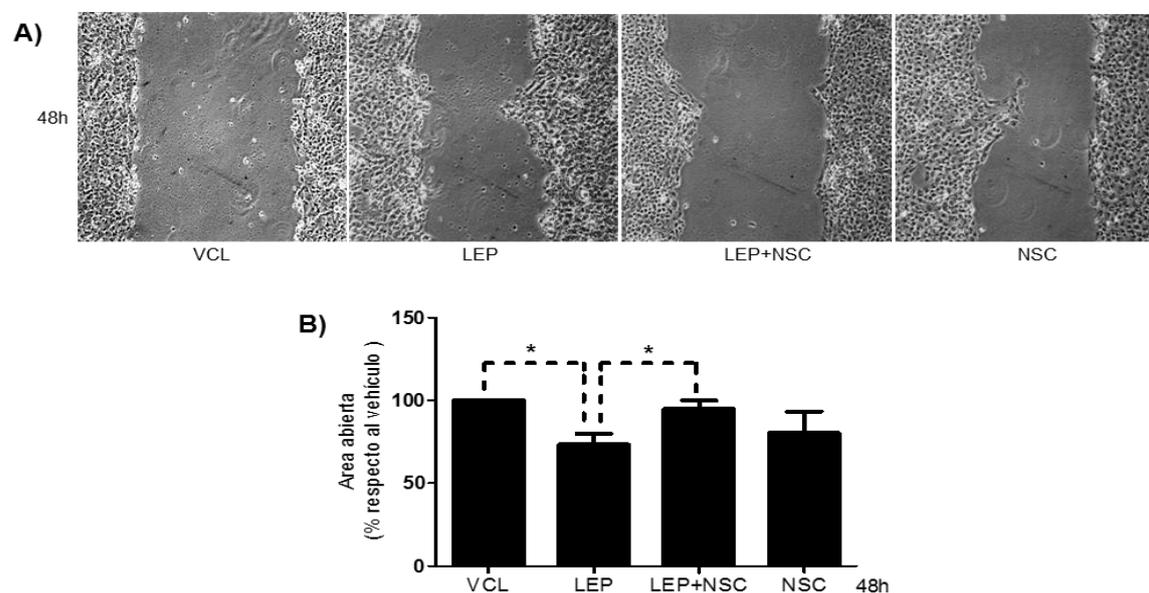


Figura 6. La leptina induce migración de células MCF10A a través de Rac1. A) imágenes representativas de los ensayos de cierre de herida en células MCF10A, tratadas con: Vehículo: Tris-HCL 10 mM pH 8.5 (VCL). 400 ng/mL leptina (LEP). 400 ng/mL leptina + 25 μ M NSC23766 (LEP+NSC) y 25 μ M NSC23766 (NSC). B) La gráfica representa el porcentaje de área abierta de la herida con respecto al control, de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$, prueba de Newman Keuls.

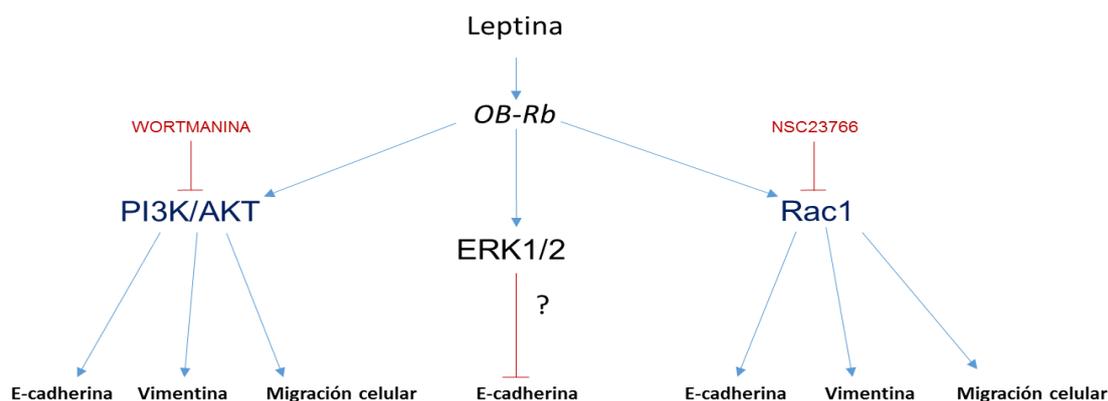


Figura 7. Modelo esquemático de la participación de PI3K y Rac1 en la TEM inducida por leptina en células MCF10A.

Discusión

La TEM es un proceso biológico en el cual las células epiteliales cambian a un fenotipo mesenquimal, caracterizado por la reducción de la adhesión celular y un aumento en la motilidad celular. La TEM confiere a las células tumorales la capacidad de escapar del tumor primario y hacer metástasis a órganos distantes (Guarino, 2007, Lamouille et al., 2014, Tomaskovic-Crook et al., 2009). Estudios realizados en las líneas celulares A549 y MCF7, derivadas de cáncer de pulmón y de mama respectivamente, muestran que la leptina promueve la TEM (Feng et al., 2014, Yan et al., 2012). En este estudio observamos que el tratamiento con leptina en células MCF10A disminuye los niveles de expresión de E-cadherina e incrementa los niveles de expresión de vimentina, lo que sugiere que la leptina induce TEM en esta línea celular. Estudios han reportado que la pérdida de E-cadherina puede llevar a la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina, fibronectina, Twist y Snail (Onder et al., 2008). Se ha descrito que la leptina activa diversas vías de señalización intracelular, incluyendo la vía de PI3K/AKT y la activación de la GTPasa Rac1. Por otra parte, la vía de PI3K/AKT y la GTPasa Rac1 participan en la TEM en distintos modelos de estudio (Lv et al., 2013, Yan et al., 2012). En el presente trabajo demostramos que la leptina induce la fosforilación de AKT y la activación de Rac1 en las células MCF10A. La fosforilación de AKT ocurre a partir de los 5 minutos de tratamiento con leptina, manteniéndose la fosforilación hasta los 60 minutos. Estudios recientes han determinado que la leptina induce la fosforilación de AKT en diferentes líneas celulares cancerígenas como condrosarcoma, cáncer de ovario, próstata y

pancreático, donde participa en la proliferación, supervivencia, secreción de citocinas inflamatorias, migración e invasión celular (*Chen et al., 2013, Fazolini et al., 2015, Mendonsa et al., 2014, Noda et al., 2015*). Por otro parte, determinamos que el estímulo con leptina induce la activación de Rac1 a los 5 minutos de tratamiento en las células MCF10A, al mismo tiempo en que la leptina induce la fosforilación de AKT. *Mendoza-Catalán 2013*, observó que la leptina promueve la fosforilación de PI3K y la activación de Rac1 a los 5 min de tratamiento en la línea celular de cáncer de mama MCF7. Nuestros resultados sugieren que la leptina activa simultáneamente a PI3K y Rac1. Sin embargo, se ha descrito que la leptina mediante PI3K promueve la actividad de Rac1 en células de cáncer de colon. No descartamos que la leptina por medio de PI3K pueda promover la actividad de Rac1 en células MCF10A, y que ambas proteínas en conjunto induzcan el proceso de TEM en esta línea celular.

Al evaluar la participación de PI3K y Rac1 en la TEM de células MCF10A, observamos que la inhibición química de PI3K como de Rac1 conlleva a la disminución en la expresión de E-cadherina, un resultado inesperado, puesto que se ha descrito que la inhibición química de PI3K o de Rac1, incrementa la expresión de E-cadherina en distintos modelos de estudio (*Du et al., 2014, Hage et al., 2009*). Nuestros datos sugieren que PI3K y Rac1 mantienen los niveles de E-cadherina en las células MCF10A. Actualmente no se ha reportado que PI3K y Rac1 favorezca la expresión de E-cadherina. No obstante, se ha determinado que la cinasa PI3K y la GTPasa Rac1 son necesarias para la formación de las uniones adherentes mediadas por E-cadherina (*Laprise et al., 2002, Nakagawa et al., 2001*). Probablemente cerca del dominio citoplasmático de E-cadherina, la cinasa PI3K genera la formación de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato como segundos mensajeros lipídicos para el reclutamiento de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que activan a Rac1 (*Welch et al., 2003*). Posteriormente Rac1 por medio de sus proteínas efectoras promueve la polimerización de actina en el dominio citoplasmático de E-cadherina para su estabilización y evitar su degradación proteosomal.

Nuestros resultados muestran que la leptina disminuye la expresión de E-cadherina independiente de PI3K y Rac1. Alternativamente el receptor a leptina puede activar las vías de JAK/STAT3 y ERK1/2, las cuales probablemente estén interviniendo en

la disminución de la expresión de E-cadherina inducida por leptina, ya que existen evidencias de la participación de estas vías en el proceso de TEM (*Balanis et al., 2013, Smith et al., 2014, Xie et al., 2004*).

Determinamos que la inhibición química de PI3K disminuye los niveles de expresión de vimentina inducidos por leptina. Por lo tanto, la cinasa PI3K participa en la expresión de vimentina inducida por leptina en células MCF10A. Estos datos se correlacionan con los obtenidos por *Yan et al 2012*, donde la leptina a través de PI3K induce la expresión de vimentina en la línea celular MCF7. Estudios han determinado que la vía PI3K/AKT participa en la vía Wnt/ β -catenina, la cual regula genes relacionados con el proceso de TEM (*Lv et al., 2013, Yan et al., 2012*). De acuerdo a estos antecedentes, sugerimos que la leptina a través de la vía PI3K/AKT, promueve la acumulación de β -catenina en núcleo formando un complejo transcripcional a través de su unión a TCF/LEF, el cual promueve la transcripción del gen de vimentina (*Gilles et al., 2003*). Por otra parte, demostramos que la leptina a través de Rac1 incrementa la expresión del marcador mesenquimal vimentina en células MCF10A. Esta participación de Rac1 en la expresión de vimentina fue también observada en células de cáncer de ovario epitelial (*Leng et al., 2014*). Sin embargo, los eventos moleculares río abajo de Rac1 que promueve la expresión de vimentina, no son claros. Investigaciones han determinado la co-localización nuclear de GEF-Tiam/Rac1 con β -catenina, aumentando la actividad del factor de transcripción TCF. También, el ligando Wnt (vía Wnt/ β -catenina) a través de sus efectores río abajo: G α q/11 β γ -PI3K-Rac1-JNK2, induce la fosforilación de β -catenina en residuos cruciales para su translocación nuclear, donde induce la transcripción del gen de vimentina (*Buongiorno et al., 2008, Wu et al., 2008*). En contraste, inesperadamente el tratamiento con únicamente el inhibidor químico de Rac1, incrementa la expresión del marcador mesenquimal vimentina, explicar este evento requerirá de investigaciones futuras. Existe evidencia que la disminución de la actividad de Rac1, es acompañada por un incremento en la actividad de Rho y una transición a un fenotipo mesenquimal (*Zondag et al., 2000*).

Las células epiteliales que adquieren un fenotipo mesenquimal, tienden a reorganizar su citoesqueleto de actina, de una manera que permite la movilidad celular. Los resultados obtenidos de los ensayos de cierre de herida, muestran que

la leptina mediante PI3K y Rac1 induce la migración de las células MCF10A. Nuestros resultados coinciden con lo observado en otros modelos de estudio, donde la inhibición de PI3K (con una dominante negativa p110 α DN, wortmanina y LY294002) y Rac1 (con NSC23766 o una dominante negativa N17Rac1) inhibe la migración e invasión celular inducida por leptina en células MDCK, LS174T y HM7 (*Attoub et al., 2000, Jaffe and Schwartz, 2008*). En este trabajo observamos que el tratamiento con solo el inhibidor de Rac1, aumenta la migración de las células MCF10A, lo cual se correlaciona con el incremento en la expresión de vimentina. Mendoza-Catalán en el 2013, observó que el tratamiento con leptina más NSC23766 induce un incremento en la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231, sin embargo, la inhibición de la GTPasa RhoA disminuye por completo la migración celular impulsada por leptina en células MDA-MB-231. Estudios han determinado que Rac1 y RhoA mantienen una regulación negativa entre sí, ya que efectores de Rac1 como PAK y WAVE inhiben la actividad de RhoA mediante la inactivación de sus GEFs, PDZ-RhoGEF y NET1-RhoGEF. RhoA es capaz de suprimir la actividad de Rac1 por medio del GAP, ARHGAP2 (*Alberts et al., 2005, Barac et al., 2004, Sanz-Moreno et al., 2008*). Lo anterior hace suponer que en nuestro modelo de estudio, la leptina inhibe la actividad de RhoA al estar hiper-activando a Rac1. Por lo tanto, el inhibidor de Rac1, favorece la actividad de RhoA. De acuerdo con *Jaffe y Schwartz en el 2008*, la actividad de RhoA toma lugar únicamente cuando Rac1 es inactivo (*Jaffe and Schwartz, 2008*).

El desarrollo y progresión del cáncer de mama, depende de alteraciones genéticas y del microambiente del tumor. Utilizando la línea celular no tumoral MCF10A, mostramos que la leptina participa la TEM, un evento temprano en la metástasis del cáncer de mama. De acuerdo a nuestros hallazgos, la leptina mediante la cinasa PI3K y la GTPasa Rac1 incrementa la expresión del marcador mesenquimal vimentina, así como la inducción de la migración celular. Determinamos que la disminución en la expresión de E-cadherina inducida por leptina es independiente de PI3K y Rac1. Además observamos que PI3K y Rac1 son necesarios para mantener los niveles de E-cadherina en las células MCF10A (Figura 7).

En conclusión, la leptina por medio de la cinasa PI3K y la GTPasa Rac1, promueve la TEM de células de epitelio de mama no tumoral MCF10A, aumentando la expresión del marcador mesenquimal vimentina, así como la migración celular.

Referencias

- ALBERTS, A. S., QIN, H., CARR, H. S. & FROST, J. A. (2005) PAK1 negatively regulates the activity of the Rho exchange factor NET1. *J Biol Chem*, 280, 12152-61.
- ARUN SATELLI, S. L. (2011) Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*, 68(18), 3033-3046.
- ATTOUB, S., NOE, V., PIROLA, L., BRUYNEEL, E., CHASTRE, E., MAREEL, M., WYMAN, M. P. & GESPACH, C. (2000) Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J*, 14, 2329-38.
- BAKIN, A. V., TOMLINSON, A. K., BHOWMICK, N. A., MOSES, H. L. & ARTEAGA, C. L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*, 275, 36803-10.
- BALANIS, N., WENDT, M. K., SCHIEMANN, B. J., WANG, Z., SCHIEMANN, W. P. & CARLIN, C. R. (2013) Epithelial to mesenchymal transition promotes breast cancer progression via a fibronectin-dependent STAT3 signaling pathway. *J Biol Chem*, 288, 17954-67.
- BARAC, A., BASILE, J., VAZQUEZ-PRADO, J., GAO, Y., ZHENG, Y. & GUTKIND, J. S. (2004) Direct interaction of p21-activated kinase 4 with PDZ-RhoGEF, a G protein-linked Rho guanine exchange factor. *J Biol Chem*, 279, 6182-9.
- BINDELS, S., MESTDAGT, M., VANDEWALLE, C., JACOBS, N., VOLDERS, L., NOEL, A., VAN ROY, F., BERX, G., FOIDART, J. M. & GILLES, C. (2006) Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene*, 25, 4975-85.
- BUONGIORNO, P., PETHE, V. V., CHARAMES, G. S., ESUFALI, S. & BAPAT, B. (2008) Rac1 GTPase and the Rac1 exchange factor Tiam1 associate with Wnt-responsive promoters to enhance beta-catenin/TCF-dependent transcription in colorectal cancer cells. *Mol Cancer*, 7, 73.
- CASAS, E., KIM, J., BENDESKY, A., OHNO-MACHADO, L., WOLFE, C. J. & YANG, J. (2011) Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*, 71, 245-54.
- CUBILLO, E., DIAZ-LOPEZ, A., CUEVAS, E. P., MORENO-BUENO, G., PEINADO, H., MONTES, A., SANTOS, V., PORTILLO, F. & CANO, A. (2013) E47 and Id1 interplay in epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 8, e59948.
- CHEN, A., BEETHAM, H., BLACK, M. A., PRIYA, R., TELFORD, B. J., GUEST, J., WIGGINS, G. A., GODWIN, T. D., YAP, A. S. & GUILFORD, P. J. (2014) E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 14, 552.
- CHEN, C., CHANG, Y. C., LAN, M. S. & BRESLIN, M. (2013) 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*, 42, 1113-9.
- DU, J., XU, R., HU, Z., TIAN, Y., ZHU, Y., GU, L. & ZHOU, L. (2011) PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1alpha expression in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*, 6, e25213.
- DU, R., XIA, L., NING, X., LIU, L., SUN, W., HUANG, C., WANG, H. & SUN, S. (2014) Hypoxia-induced Bmi1 promotes renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition and renal fibrosis via PI3K/Akt signal. *Mol Biol Cell*, 25, 2650-9.
- FAZOLINI, N. P., CRUZ, A. L., WERNECK, M. B., VIOLA, J. P., MAYA-MONTEIRO, C. M. & BOZZA, P. T. (2015) Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and increased cell proliferation. *Cell Cycle*, 14, 2667-76.
- 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. *Oncol Res*, 21, 165-71.

- GAROFALO, C., KODA, M., CASCIO, S., SULKOWSKA, M., KANCZUGA-KODA, L., GOLASZEWSKA, J., RUSSO, A., SULKOWSKI, S. & SURMACZ, E. (2006) Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res*, 12, 1447-53.
- GILLES, C., POLETTE, M., MESTDAGT, M., NAWROCKI-RABY, B., RUGGERI, P., BIREMBAUT, P. & FOIDART, J. M. (2003) Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 63, 2658-64.
- GONZALEZ, D. M. & MEDICI, D. (2015) Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 7, re8.
- GRILLE, S. J., BELLACOSA, A., UPSON, J., KLEIN-SZANTO, A. J., VAN ROY, F., LEE-KWON, W., DONOWITZ, M., TSICHLIS, P. N. & LARUE, L. (2003) The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*, 63, 2172-8.
- GUARINO, M. (2007) Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 2153-60.
- HAGE, B., MEINEL, K., BAUM, I., GIEHL, K. & MENKE, A. (2009) Rac1 activation inhibits E-cadherin-mediated adherens junctions via binding to IQGAP1 in pancreatic carcinoma cells. *Cell Commun Signal*, 7, 23.
- HELFAND, B. T., MENDEZ, M. G., MURTHY, S. N., SHUMAKER, D. K., GRIN, B., MAHAMMAD, S., AEBI, U., WEDIG, T., WU, Y. I., HAHN, K. M., INAGAKI, M., HERRMANN, H. & GOLDMAN, R. D. (2011) Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell*, 22, 1274-89.
- JAFFE, T. & SCHWARTZ, B. (2008) Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Int J Cancer*, 123, 2543-56.
- LAMOUILLE, S., XU, J. & DERYNCK, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 178-96.
- LAPRISE, P., CHAILLER, P., HOUDE, M., BEAULIEU, J. F., BOUCHER, M. J. & RIVARD, N. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem*, 277, 8226-34.
- LENG, R., LIAO, G., WANG, H., KUANG, J. & TANG, L. (2014) Rac1 expression in epithelial ovarian cancer: effect on cell EMT and clinical outcome. *Med Oncol*, 32, 329.
- LIU, Z., CHEN, L., ZHANG, X., XU, X., XING, H., ZHANG, Y., LI, W., YU, H., ZENG, J. & JIA, J. (2014) RUNX3 regulates vimentin expression via miR-30a during epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells. *J Cell Mol Med*, 18, 610-23.
- LV, Z., HU, M., ZHEN, J., LIN, J., WANG, Q. & WANG, R. (2013) Rac1/PAK1 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition of podocytes in vitro via triggering beta-catenin transcriptional activity under high glucose conditions. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 255-64.
- MAZDA, M., NISHI, K., NAITO, Y. & UI-TEI, K. (2011) E-cadherin is transcriptionally activated via suppression of ZEB1 transcriptional repressor by small RNA-mediated gene silencing. *PLoS One*, 6, e28688.
- MENDONSA, A. M., CHALFANT, M. C., GORDEN, L. D. & VANSANUN, M. N. (2014) Modulation of the leptin receptor mediates tumor growth and migration of pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 10, e0126686.
- MENDOZA CATALÁN, C. S. A. A. L., 2013 (2013) Participación de las GTPasas Rac1 y Rho en la migración e invasión de células de cáncer de mama en respuesta a leptina. *UACQB*. chilpancingo, Gro. Mex, Universidad Autónoma de Guerrero.
- MICALIZZI, D. S., FARABAUGH, S. M. & FORD, H. L. (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 117-34.

- NAKAGAWA, M., FUKATA, M., YAMAGA, M., ITOH, N. & KAIBUCHI, K. (2001) Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci*, 114, 1829-38.
- NEWMAN, G. & GONZALEZ-PEREZ, R. R. (2014) Leptin-cytokine crosstalk in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 382, 570-82.
- NODA, T., KIKUGAWA, T., TANJI, N., MIURA, N., ASAI, S., HIGASHIYAMA, S. & YOKOYAMA, M. (2015) Longterm exposure to leptin enhances the growth of prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 46, 1535-42.
- ONDER, T. T., GUPTA, P. B., MANI, S. A., YANG, J., LANDER, E. S. & WEINBERG, R. A. (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*, 68, 3645-54.
- PENICAUD, L., MEILLON, S. & BRONDEL, L. (2012) Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie*, 94, 2069-74.
- SANTIBANEZ, J. F., KOCIC, J., FABRA, A., CANO, A. & QUINTANILLA, M. (2010) Rac1 modulates TGF-beta1-mediated epithelial cell plasticity and MMP9 production in transformed keratinocytes. *FEBS Lett*, 584, 2305-10.
- SANZ-MORENO, V., GADEA, G., AHN, J., PATERSON, H., MARRA, P., PINNER, S., SAHAI, E. & MARSHALL, C. J. (2008) Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*, 135, 510-23.
- SHEN, H. J., SUN, Y. H., ZHANG, S. J., JIANG, J. X., DONG, X. W., JIA, Y. L., SHEN, J., GUAN, Y., ZHANG, L. H., LI, F. F., LIN, X. X., WU, X. M., XIE, Q. M. & YAN, X. F. (2014) Cigarette smoke-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition is mediated by Rac1 activation. *Biochim Biophys Acta*, 1840, 1838-49.
- SHINTANI, Y., WHEELOCK, M. J. & JOHNSON, K. R. (2006) Phosphoinositide-3 kinase-Rac1-c-Jun NH2-terminal kinase signaling mediates collagen I-induced cell scattering and up-regulation of N-cadherin expression in mouse mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 17, 2963-75.
- SMITH, B. N., BURTON, L. J., HENDERSON, V., RANDLE, D. D., MORTON, D. J., SMITH, B. A., TALIAFERRO-SMITH, L., NAGAPPAN, P., YATES, C., ZAYZAFON, M., CHUNG, L. W. & ODERO-MARAH, V. A. (2014) Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2. *PLoS One*, 9, e104987.
- SURMACZ, E. (2007) Obesity hormone leptin: a new target in breast cancer? *Breast Cancer Res*, 9, 301.
- TOMASKOVIC-CROOK, E., THOMPSON, E. W. & THIERY, J. P. (2009) Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 11, 213.
- TONG, J., LI, L., BALLERMANN, B. & WANG, Z. (2013) Phosphorylation of Rac1 T108 by extracellular signal-regulated kinase in response to epidermal growth factor: a novel mechanism to regulate Rac1 function. *Mol Cell Biol*, 33, 4538-51.
- VANSAUN, M. N. (2013) Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. *Clin Cancer Res*, 19, 1926-32.
- VEERARAGHAVALU, K. S., V. K. SRIVASTAVA, S. CHAKRABARTI, O. SYAL, R. KRISHNA, S. (2005) Complementation of human papillomavirus type 16 E6 and E7 by Jagged1-specific Notch1-phosphatidylinositol 3-kinase signaling involves pleiotropic oncogenic functions independent of CBF1;Su(H);Lag-1 activation. *J Virol*, 79, 7889-98.
- VILLAREJO, A., CORTES-CABRERA, A., MOLINA-ORTIZ, P., PORTILLO, F. & CANO, A. (2014) Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 289, 930-41.
- WELCH, H. C., COADWELL, W. J., STEPHENS, L. R. & HAWKINS, P. T. (2003) Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett*, 546, 93-7.
- WU, X., TU, X., JOENG, K. S., HILTON, M. J., WILLIAMS, D. A. & LONG, F. (2008) Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell*, 133, 340-53.

- XIE, L., LAW, B. K., CHYTIL, A. M., BROWN, K. A., AAKRE, M. E. & MOSES, H. L. (2004) Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia*, 6, 603-10.
- YAN, D., AVTANSKI, D., SAXENA, N. K. & SHARMA, D. (2012) Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires beta-catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways. *J Biol Chem*, 287, 8598-612.
- YANG, W. H., LAN, H. Y., HUANG, C. H., TAI, S. K., TZENG, C. H., KAO, S. Y., WU, K. J., HUNG, M. C. & YANG, M. H. (2012) RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration. *Nat Cell Biol*, 14, 366-74.
- YOM, C. K., LEE, K. M., HAN, W., KIM, S. W., KIM, H. S., MOON, B. I., JEONG, K. Y., IM, S. A. & NOH, D. Y. (2013) Leptin as a potential target for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Breast Cancer*, 16, 138-45.
- ZEISBERG, M. N., E. G. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119, 1429-37.
- ZHOU, Y. & RUI, L. (2013) Leptin signaling and leptin resistance. *Front Med*, 7, 207-22.
- ZONDAG, G. C., EVERS, E. E., TEN KLOOSTER, J. P., JANSSEN, L., VAN DER KAMMEN, R. A. & COLLARD, J. G. (2000) Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 149, 775-82.