



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“PAPEL DE SRC SOBRE MARCADORES CLÁSICOS DE LA  
TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL EN CÉLULAS  
EPITELIALES MAMARIAS ESTIMULADAS CON LEPTINA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**Q.P.B. JUAN CARLOS JUÁREZ CRUZ**

**DIRECTOR: DR. NAPOLEÓN NAVARRO TITO**

**CODIRECTOR: DR. MIGUEL ÁNGEL MENDOZA CATALÁN**

**CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DE 2017.**



**LABORATORIO  
BIOLOGÍA  
CELULAR DEL CÁNCER**

**UACQB**



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

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 26 días del mes de junio de dos mil diecisiete se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Papel de Src sobre marcadores clásicos de la Transición Epitelio-Mesenquimal en células epiteliales mamarias estimuladas con leptina", presentada por el alumno Juan Carlos Juárez Cruz, 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. Napoleón Navarro Tito  
Dirección de tesis

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Alejandro Millán Vega

Dr. Raúl Adrián Martínez Orozco

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
 UAGro  
Coordinación del Posgrado de la Facultad de  
Ciencias Químico Biológicas  
Coordinación 2014-2018

Vo. Bo

Dra. Aralia Vences Velázquez  
Directora de la Facultad de Ciencias Químico  
Biológicas  
 UAGro  
Unidad Académica de  
Ciencias Químico Biológicas  
DIRECCIÓN 2014 - 2018

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

**Bajo la dirección del**

Dr. Napoleón Navarro Tito

**Co-director**

Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán

**Bajo la asesoría de:**

Dr. Raúl Adrián Martínez Orozco

Dr. Gloria Fernández Tilapa

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Alejandro Millán Vega

El presente trabajo fue financiado por el fondo para la investigación SEP/CONACYT, proyecto CB-2014-01-239870 otorgado al Dr. Napoleón Navarro Tito. Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Juan Carlos Juárez Cruz recibió beca del CONACYT.

## DEDICATORIAS

Este pedazo de mi historia se la dedico a mi familia, más que un logro para mí es un logro de ellos, y es que tal vez en el dinero busques la felicidad, en las amistades busques alegrías, en las medicinas la cura para tu enfermedad, pero el amor solo lo buscas y encuentras en tu familia. A mi familia le debo todo.

A mi madre Marcela Cruz, amor como el de la madre no hay ninguno, siempre has estado a mi lado y me has apoyado en todos mis proyectos. Tú siempre pidiendo a Dios por mí. Nunca me has dejado solo en la vida, has estado conmigo en todo momento, en cada paso, derrota, victoria, logro pequeño o grande, más que yo ser un orgullo para ti, tú eres un orgullo para mí, eres una persona única e inquebrantable, y es que Dios no podía estar en todas partes, por eso creó te creo a ti. Este esfuerzo es de ti y para ti.

A mi padre Celestino Juárez que me brindo de todo su cariño cuanto estuvo a mi lado, sigues desde mi corazón y mente alentándome a ser el mejor.

A cada uno de los miembros de mi familia. Luz siempre encuentras la manera de ayudarme y apoyarme; Manuel, tu mi hermano menor que es más grande que yo en esa mente, y que siempre eres poco expresivo pero nunca me dejas solo; Antonio siempre pendiente de nuestra familia; Moisés y Cheli una gran felicidad en mi vida como hermanos, pero que ante todo espero ser un ejemplo para ustedes. A mi sobrina Alelí, cuando estés grande sabrás que eras una compañera importante para este proyecto. Mis tíos Juan, Ceci y Pedro, que siempre están presentes en mi vida este logro también va dedicado a ustedes por todo lo que significó para ustedes.

A mi novia Angélica Martínez, este logro es de los dos. Eres la compañera de mi camino, no podría imaginarme empezar o terminar ningún proyecto sin ti. Has luchando día a día a mi lado siendo una parte esencial en mi vida, espero que vengan más logros juntos. Esto va dedicado a ti por el amor que ambos nos tenemos.

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Napoleón Navarro Tito, agradezco todas las enseñanzas de ciencia y de vida. Gracias por todo el apoyo brindado a lo largo de mi formación académica y sobre todo a la gran confianza que ha depositado en mí desde hace mucho tiempo.

A mis sinodales Dr. Miguel, Dr. Eduardo, Dra. Gloria, Dr. Raúl y Dr. Alejandro, les agradezco por todas las observaciones y contribuciones a este trabajo, no podría tener un trabajo como este sin su valiosa participación. Siempre lograron el cometido de demostrarme que debo de esforzarme más en este camino que he elegido.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos de laboratorio, aportando principalmente alegría a mi estancia en el laboratorio. Chicos cadmio, chicos Beta-caroteno, chicos #TeamTito, no me alcanzarían las palabras para mencionar y agradecer a varias generaciones con las que he convivido. Oscar Eduardo y José Eduardo donde quiera que estén los extrañe mucho en lo que resto de este trabajo, grandes compañeros y amigos de laboratorio, ustedes hicieron buena la estancia en el laboratorio, muchas gracias. Monse gracias por la amistad que me has brindado nos conocíamos desde antes pero ahora la coincidencia me llevo a conocerte más y valorar tu amistad. Fernanda agradezco todas las charlas nunca fueron aburridas, siempre hablando de cualquier, me encanta tu bullying porque soportas el mío, gracias por alegrar el día. Charly te agradezco el ser una persona que sabe escuchar, eres una gran amigo, a donde vayas vas a triunfar, con ese manejo de estrés tan tuyo, no dudes que nos volveremos. Ruby te agradezco tu amistad y esa nobleza que te define, nunca olvido que reconociste mi esfuerzo. Vianney e Isamar saben que las estimo mucho, las considero mis amigas, y sé que estaremos coincidiendo en el camino, gracias por su amistad.

A mis compañeros de generación los X-men que volvieron esta travesía divertida y poco estresante. Oscar y Sammy, no duden que siempre los considere mis amigos, más que mis compañeros, son grandes personas. Vicky gracias por tu humor y optimismo es el mejor muchas gracias. Miying muchas gracias por brindarme una amistad que no teníamos a pesar de conocernos desde hace tiempo, te aprecio mucho.

Blanca, muchísimas gracias por el apoyo en este proyecto y por la amistad que hemos mantenido durante el paso de los años. Gracias, Genaro y Maggie por todas las risas y charlas, han sido indispensables en sobrellevar los días en el laboratorio.

***“Si dejas que pase el tiempo sin hacer nada, pronto te darás cuenta de que solo vas a vivir una única vez... aunque tan solo sean 7 horas y 1 segundo”***

*Anónimo*

***“Lo que sabemos es una gota, lo que ignoramos un inmenso océano”***

*Isaac Newton*

***“Todo aquel que está seriamente comprometido con el cultivo de la ciencia, llega a convencerse de que en todas las leyes del universo esta manifiesto un espíritu infinitamente superior al hombre, y ante el cual, nosotros con nuestros poderes debemos sentirnos humildes”***

*Albert Einstein*

# **“Papel de Src sobre marcadores clásicos de la Transición Epitelio-Mesenquimal en células epiteliales mamarias estimuladas con leptina”**

## **INDICE**

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
<b>Materiales y métodos</b> .....	6
Reactivos: .....	6
Cultivo celular .....	6
Estimulación de células.....	6
Silenciamiento de Src .....	7
Western blot.....	7
Ensayo de migración celular por cierre de herida .....	7
Inmunofluorescencia .....	8
Análisis estadístico.....	8
<b>Resultados</b> .....	9
Leptina induce la activación de la cinasa Src en la línea celular MCF10A.....	9
La cinasa Src regula la expresión de E-cadherina y vimentina en la línea celular MCF10A estimulada con leptina .....	9
La migración celular inducida por leptina es dependiente de la señalización de la cinasa Src en la línea celular MCF10A .....	15
<b>Discusión</b> .....	17
<b>Conclusiones</b> .....	23
<b>Referencias</b> .....	24

## Resumen

**Antecedentes:** Diversos estudios han asociado a la obesidad con el cáncer de mama (CaMa). La leptina es una hormona secretada por los adipocitos que incrementa durante la obesidad y experimentalmente se ha mostrado que puede promover el CaMa a través de diversos procesos biológicos. La Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) es un proceso biológico que conlleva a que una célula epitelial experimente una transdiferenciación a un fenotipo mesenquimal, adquiriendo con esto una alta capacidad migratoria e invasiva, características importantes durante la metástasis. La pérdida de E-cadherina y la ganancia de vimentina son considerados marcadores clásicos de EMT. Src es una cinasa involucrada en procesos de EMT, sin embargo, no se ha reportado la participación de Src en la EMT inducida por leptina en células epiteliales mamarias. **Objetivo:** Evaluar el papel de Src sobre los marcadores canónicos de la EMT en la línea celular MCF10A estimulada con leptina. **Materiales y métodos:** Se utilizó la línea celular no tumorigénica MCF10A de epitelio mamario no tumoral. Como estímulo se utilizó una dosis de leptina de 400 ng/mL. Para evaluar el papel de Src en la EMT inducida por leptina se utilizó el inhibidor químico PP2 y PP3, además de un siRNA específico para Src y un siRNA control. Los cambios en la expresión o fosforilación de Src se detectaron mediante Western blot e inmunofluorescencia y para evaluar la migración celular se realizaron ensayos de migración por cierre de herida. **Resultados:** Leptina induce la activación de la cinasa Src de manera específica de tiempo. El nivel de expresión de E-cadherina y vimentina es dependiente de la actividad cinasa de Src en células MCF10A estimuladas con leptina. La migración celular inducida por leptina es dependiente de la actividad de la cinasa Src. **Conclusiones:** Leptina induce la activación de la cinasa Src y la regulación de marcadores canónicos de la EMT a través de una vía dependiente de la cinasa Src en células MCF10A.

**Palabras clave:** cáncer de mama, EMT, leptina, Src.

## **Abstract**

**Background:** Several studies demonstrate an association between obesity and breast cancer (BC). Leptin is a hormone secreted by adipocytes which increases during obesity. Experimental evidence shown that leptin may promote BC through various biological processes. The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is a biological process by which an epithelial cell undergoes a transdifferentiation to a mesenchymal phenotype, acquiring a high migratory and invasive capacity, which are important characteristics during metastasis. The loss of E-cadherin and the gain of EMT canonical markers. Src is a kinase involved in the EMT processes; however, involvement of Src in leptin-induced EMT in mammary epithelial cells has not been reported. **Objective:** To evaluate the role of Src in leptin-induced EMT in the MCF10A cell line. **Materials and methods:** The non-tumorigenic cell line MCF10A of mammary epithelium was used. As a stimulus, a leptin dose of 400 ng/ml was used. To evaluate the role of Src on EMT markers induced by leptin, we used the chemical inhibitors PP2, PP3, as well as a specific siRNA for Src. Changes in the expression or phosphorylation of Src was evaluated by Western blot and immunofluorescence. Cell migration was evaluated by wound closure assays. **Results:** The results show that leptin induces activation of the Src kinase in a time specific manner. In addition, the level of expression and localization of E-cadherin and vimentin is dependent on Src kinase in leptin-stimulated MCF10A cells and that leptin-stimulated cell migration via a Src kinase-dependent pathway. **Conclusions:** Leptin induces activation of Src kinase and EMT through a Src kinase-dependent pathway in MCF10A cells.

**Key words:** breast cancer, EMT, leptin, Src

## Introducción

La Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) es un proceso en el cual una célula epitelial experimenta transdiferenciación a una célula con fenotipo mesenquimal. Con este cambio las células mesenquimales adquieren una capacidad migratoria e invasiva elevada, así como resistencia a la apoptosis y anoikis. La EMT inicialmente fue descrita en procesos no patológicos como el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas, sin embargo, actualmente el significado clínico más relevante de la EMT está relacionado con su papel en la metástasis de diversos tipos de cáncer (Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg & Neilson, 2009).

Durante la EMT ocurre la pérdida de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimales. Entre los principales marcadores epiteliales que se pierden son E-cadherina,  $\alpha$ -catenina, ocludinas, claudinas y citoqueratinas (Zeisberg & Neilson, 2009; Yan *et al.*, 2012). Mientras que los principales marcadores mesenquimales que se ganan son vimentina, N-cadherina, metaloproteasas de matriz (MMP-2 y 9), así como factores de la transcripción relacionados con la EMT como Snail, Slug, Twist y Zeb (Liu *et al.*, 2015; Tsai & Yang, 2015; Moyret-Lalle, 2014). No obstante, en diferentes tipos celulares se ha considerado la pérdida de E-cadherina y ganancia de vimentina como marcadores clásicos de la EMT. E-cadherina es una glicoproteína de 120 kDa y desempeña la función primaria de mantener las adhesiones célula-célula de manera dependiente de calcio. La pérdida de E-cadherina conduce a la pérdida de la polaridad celular del fenotipo epitelial, un evento importante para el inicio y progresión de la EMT (van Roy & Berx, 2008, Yan *et al.*, 2012). Vimentina es una proteína de 57 kDa que integra los filamentos intermedios. La formación de filamentos de vimentina permite de manera primaria regular la arquitectura y rigidez celular de las células migratorias. Adicionalmente vimentina regula procesos como la direccionalidad de la migración, la polaridad de microtúbulos, la formación de adhesiones focales nacientes y las fuerzas de contracción necesarias para la translocación celular, en células mesenquimales migratorias (Dave & Bayless, 2014; Liu *et al.*, 2015).

Leptina es una hormona de 16 kDa, constituida por 167 aminoácidos, siendo el tejido adiposo el principal tejido secretor (Frühbeck, 2006). Leptina tiene como función primaria la regulación de la ingesta calórica y el gasto energético a nivel del hipotálamo, no obstante, diversos estudios muestran una asociación importante entre la leptina y el cáncer de mama. Estudios clínicos indican que los niveles séricos de leptina son más altos en pacientes con CaMa en comparación con pacientes sin la enfermedad; mientras que en tejido tumoral y metastásico de CaMa, tanto la leptina como su receptor, el Ob-R, están sobreexpresados en comparación con tejido normal (Garofalo *et al.*, 2006; Mohammadzadeh *et al.*, 2014). Estudios experimentales en líneas celulares de CaMa, como MCF7, MDA-MB-231, SK-BR3 y T47D, se ha demostrado que la leptina induce proliferación, supervivencia, angiogénesis, migración e invasión celular a través de la señalización de diversas vías oncogénicas como JAK2/STAT3, ERK1/2, Akt/GSK3, Notch, mTOR y Src/FAK (Guo *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012).

Src es una proteína tirosina cinasa no receptora con un peso molecular de 60 kDa. En su estado inactivo esta cinasa presenta una estructura de autoinhibición debido a la interacción de su dominio SH2 con la Y530 fosforilada localizada en el C-terminal y del dominio SH3 con una secuencia rica en prolina de Src. La activación de esta cinasa se efectúa inicialmente por interacción con diversas proteínas que son reconocidas a través del dominio SH2 y SH3 de Src, induciendo la defosforilación de la Y530 y la autofosforilación de la Y419 localizada en su dominio cinasa, promoviendo la activación completa y la estabilidad de su estado activo (Yeatman 2004; Roskoski, 2015). La activación de Src conduce a la interacción con múltiples moléculas, ya sean ciertos receptores con actividad tirosina cinasa, integrinas, moléculas de señalización como FAK y proteínas sustrato de Src, posicionando a esta cinasa como una molécula central de diversos procesos celulares (Roskoski, 2015). Estudios clínicos relacionan un aumento en la expresión y activación de Src con tipos de cáncer altamente invasivos, recurrencia de este tipo de cáncer y una disminución de la supervivencia en estos pacientes (Elsberger *et al.*, 2009; Anbalagan *et al.*, 2012). En estudios experimentales en líneas celulares de CaMa, se ha observado que esta cinasa se encuentra sobreexpresada e hiperactivada regulando diversos procesos celulares

como proliferación, supervivencia, migración e invasión celular de manera dependiente de la señalización de Src y FAK (González *et al.*, 2006; Sánchez-Bailón *et al.*, 2012).

En células de CaMa, MCF7 y MDA-MB-231 la supresión de la actividad y la expresión de Src, revierte el proceso de EMT, reflejado por un aumento de E-cadherina, disminución de vimentina y la disminución de la tasa de migración celular (Nam *et al.*, 2002; Liu & Feng, 2010). Mientras que en células epiteliales de mama no tumorales MCF10A, el incremento en la expresión esta cinasa, aumenta la migración e invasión celular (Baumgartner *et al.*, 2008).

Recientemente se ha descrito a la leptina como un inductor de la EMT en células MCF7, SK-BR3 y MCF10A (Yan *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2017; Villanueva Duque *et al.*, 2017). En células MCF10A, la leptina induce un aumento en la tasa de migración celular, acompañado de cambios en los niveles de E-cadherina y vimentina. Adicionalmente los niveles de estos marcadores de EMT son regulados por moléculas asociadas a Src como la cinasa FAK (Villanueva Duque *et al.*, 2017). En este estudio se evaluó el papel de Src sobre la regulación de marcadores de EMT en la línea de epitelio mamario no tumoral MCF10A estimulada con leptina.

## **Materiales y métodos**

**Reactivos:** La leptina recombinante humana (L4146), el inhibidor PP2 (P0042), el inhibidor PP3 (529574) y el Ara C (C1768) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO.). Los siRNAs específicos para Src (sc-29228) y siRNA control (sc-37007), los anticuerpos específicos para Src (sc-19), E-cadherina (sc-21791), Vimentina (sc-6260), Tubulina (sc-7210), IgG Mouse (sc-2005), IgG Mouse Alexa Fluor488 (sc-3890) fueron comprados de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA.). La Lipofectamida 2000 fue obtenida de Thermo Fisher Scientific. El anticuerpo específico para GAPDH (14C10) fue obtenido de Cell Signaling Technology; el anticuerpo específico para Src(P)Y418 (MBS395378) fue obtenido de MyBioSource; y el anticuerpo específico para IgG Rabbit (AP307P) fue obtenido de Millipore.

**Cultivo celular:** La línea celular MCF10A se cultivó en medio DMEM/F12 (1:1) (Sigma-Aldrich, D8900) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) (ByProducts, Guadalajara, Jalisco), 10 µg/mL de insulina, 0.5 µg/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, H0888), 20 ng/mL de EGF (Sigma-Aldrich, E5036) y antibióticos (Gibco, 15240). Los cultivos se incubaron en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C. Para la realización de los experimentos, los cultivos confluentes se sometieron a supresión de suero durante 4 h antes del tratamiento.

**Estimulación de células:** Para determinar los niveles de activación de Src, se realizó un ensayo curso temporal con 400 ng/mL de leptina durante 0, 5, 10, 15, 30 y 60 min. Posterior a los tiempos de incubación el estímulo se detuvo por aspiración del medio, solubilizando las proteínas en buffer de lisis Tritón (Tris-HCl 50 mM, NaCl 160 mM, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, Triton X-100 1%, Glicerol 10%), para finalmente analizar los niveles de fosforilación de Src mediante Western blot. Para determinar el papel de Src en la expresión proteica de E-cadherina y vimentina, las células se sometieron a pre-tratamiento con 10 µM de PP2 y PP3 durante 30 min, o silenciamiento de Src con siRNA específico y control. Los tratamientos con vehículo de leptina (Tris-HCl) y 400 ng/mL de leptina, fueron durante 24 h. Posterior al tiempo de estimulación, los tratamientos se detuvieron por aspiración del medio, solubilizando las proteínas en

buffer de lisis Tritón, para finalmente analizar los niveles de expresión de E-cadherina y vimentina por Western blot.

**Silenciamiento de Src:** Las células MCF10A se cultivaron en placas de 60 mm hasta alcanzar una confluencia del 40%. Antes de la transfección, las células se sometieron a supresión de suero durante 4 h. Se incubó a temperatura ambiente, por separado 5  $\mu$ l de Lipofectamida 2000 y 30 nM de los siRNAs con 100  $\mu$ l de medio de transfección, durante 15 min. Posteriormente estas se mezclaron, e incubaron durante 30 min. La mezcla de transfección se añadió a las células junto con 1.3 mL de medio de transfección durante 6 h, añadiendo posteriormente medio DMEM/F12 suplementado con SFB 2X durante 24 h. A las 30 h tras la transfección, se añadió medio fresco a las células y se incubó durante 24 h adicionales. Después de 48 h de transfección, las células se sometieron a supresión de suero y se estimularon con leptina o vehículo de leptina durante 24 h adicionales, para finalmente realizar la extracción de proteínas totales.

**Western blot:** Los extractos de proteínas totales de cada condición fueron separados por SDS-PAGE al 10% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con 5% de leche descremada en solución de lavado (TBS/Tween-20 0.05%) e incubó con anticuerpos primarios a una dilución 1:1000 durante 12 h a 4°C. Las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario anti-IgG Rabbit o anti-IgG Mouse a una dilución 1:5000 por 2 h a 22°C. Finalmente, se realizó la inmunodetección usando un estuche de quimioluminiscencia y placas autoradiográficas. La intensidad relativa de las bandas de Western blot se determinó por medio de análisis densitométrico de las bandas empleando el programa ImageJ.

**Ensayo de migración celular por cierre de herida:** El ensayo de migración celular se realizó en un cultivo confluyente al 100%, agregando como pre-tratamiento 10  $\mu$ M del inhibidor de proliferación celular Ara C durante 2 h, junto con un pre-tratamiento de 10  $\mu$ M del inhibidor PP2 o PP3 durante 30 min. Posteriormente se realizó una herida al cultivo celular con una punta amarilla estéril (200  $\mu$ L), añadiendo vehículo de leptina o 400 ng/mL de leptina como tratamiento. Después de 48 h de incubación, las células se fijaron con PBS/Formaldehído al 4%, y se tomaron fotografías de las diferentes

condiciones usando el objetivo 40X de un microscopio de campo claro. Las mediciones del cierre de herida para cada condición se realizaron con el programa ImageJ.

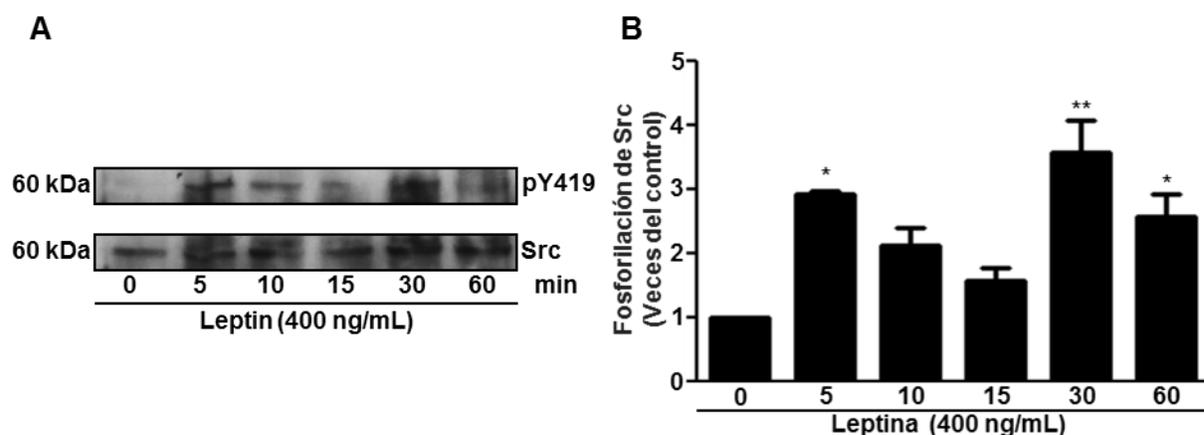
**Inmunofluorescencia:** Las células se crecieron en cubreobjetos de 12 mm de diámetro para posteriormente someterse a pre-tratamiento con 10  $\mu$ M de PP2 o PP3 durante 30 min, y tratamientos con vehículo de leptina (Tris-HCl) y 400 ng/mL de leptina durante 24 h. Terminado el tratamiento las células fueron fijadas y permeabilizadas con formaldehído al 4% y Triton X-100 al 0.5% respectivamente. Posteriormente las células se bloquearon con BSA al 3% durante 2 h a 4 °C. Posterior al bloqueo las células se incubaron con el anticuerpo específico para E-cadherina o vimentina a una dilución 1:200 por 2 h a 22°C, así como con anticuerpo secundario anti-mouse Alexa488 a una dilución 1:500 por 30 min a 37°C. Finalmente los cubreobjetos se montaron en un portaobjeto con una gota de Fluoroshield con DAPI, la visualización se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia.

**Análisis estadístico:** Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  S.D. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA acompañados de una prueba de comparación múltiple de Dunnett's o de Newman-Keuls, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5.0. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## Resultados

### Leptina induce la activación de la cinasa Src en la línea celular MCF10A

Para determinar el efecto de leptina sobre los niveles de activación de Src en la línea celular MCF10A, se realizaron ensayos curso temporal a una dosis de leptina de 400 ng/mL. Debido a que se ha descrito que el estado fosforilado de la Y419 de Src refleja el estado activo de esta cinasa, se realizó Western blot con anticuerpos específicos para la pY419 y Src total, este ultimo como control de carga. Los resultados muestran que leptina induce la activación de Src a partir de los 5 min, una disminución de esta a los 15 min, y un pico máximo a los 30 min (Figura 1). Estos resultados indican que leptina induce la activación de la cinasa Src en la línea celular de epitelio mamario no tumoral MCF10A.

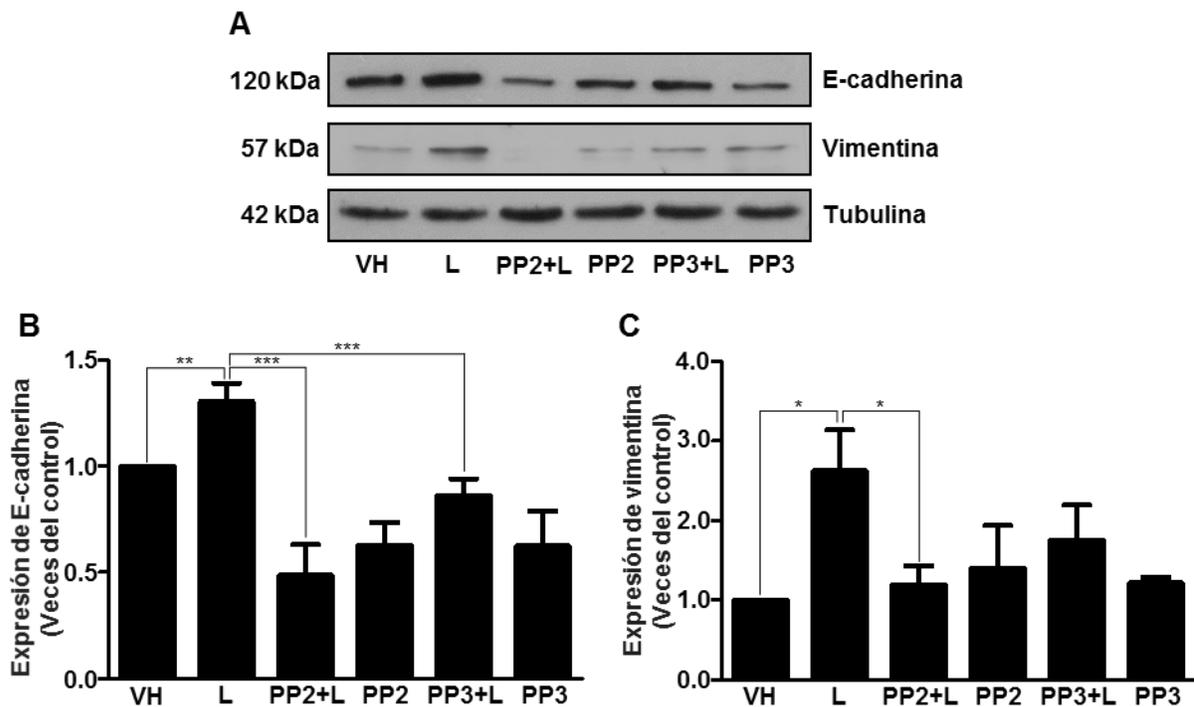


**Figura 1. Leptina induce la activación de Src en la línea celular MCF10A.** Panel A. Las células MCF10A fueron tratadas con 400 ng/mL de leptina durante 0, 5, 10, 15, 30 y 60 min. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos para Src pY419 y Src total como control de carga. Panel B. Gráfica que muestra la densitometría de las bandas en A. La imagen es representativa de dos experimentos independientes. La significancia estadística fue calculada mediante ANOVA y Dunnett's. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs control (células no tratadas con leptina).

### La cinasa Src regula la expresión de E-cadherina y vimentina en la línea celular MCF10A estimulada con leptina

Para evaluar el papel de Src sobre los niveles de expresión de E-cadherina y vimentina en células MCF10A estimuladas con leptina, se utilizó el inhibidor químico de Src, PP2 y su análogo inactivo PP3. Los resultados muestran que los niveles

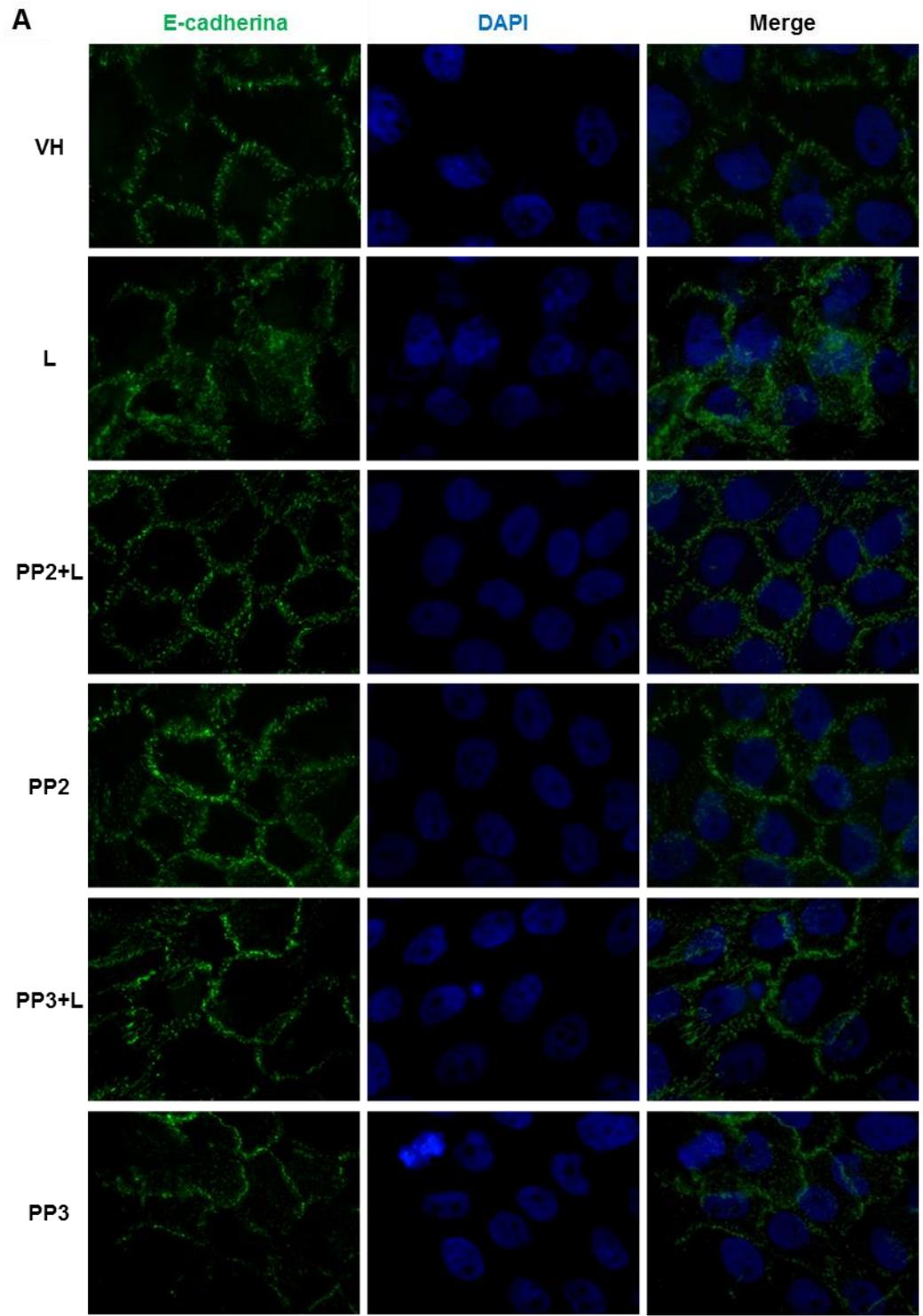
proteicos de E-cadherina y vimentina aumentan cuando se utiliza leptina como estímulo y disminuyen cuando se inhibe la actividad cinasa de Src con PP2 (Figura 2A-C). A pesar de que el inhibidor químico PP3 no inhibe la actividad cinasa de Src, de manera interesante se observó que el inhibidor PP3, también disminuye los niveles de expresión de E-cadherina y vimentina tras la estimulación con leptina, manteniendo la expresión comparada con el control (Figura 2A-C). Estos resultados indican que el aumento en los niveles de E-cadherina y vimentina es dependiente de la actividad cinasa de Src en la línea celular MCF10A estimulada con leptina.

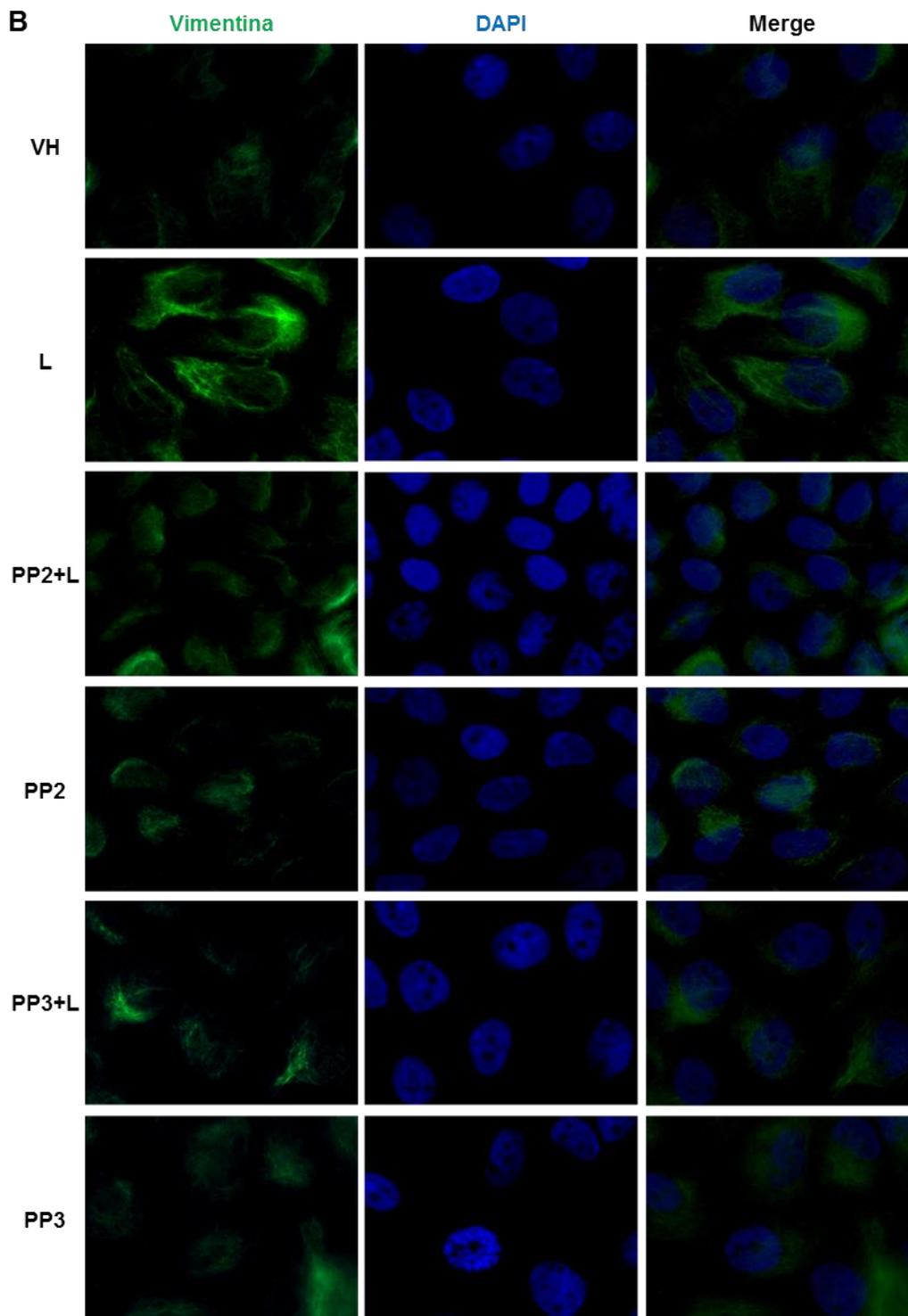


**Figura 2. Src regula los niveles de expresión de E-cadherina y vimentina en la línea celular MCF10A estimulada con leptina. Panel A.** Las células MCF10A fueron pre-tratadas con 10  $\mu$ M de PP2 o PP3, y tratadas con 400 ng/mL de leptina durante 24 h. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos para E-cadherina, vimentina y tubulina. **Panel B y C.** Gráfica que muestra la densitometría de las bandas en A. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue calculada mediante ANOVA y Newman Keuls. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control (células no tratadas con leptina).

Para determinar si la localización subcelular de E-cadherina y vimentina depende de la actividad cinasa de Src se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando los inhibidores PP2 y PP3. Los resultados muestran que tras el estímulo con leptina, ocurre una redistribución subcelular de E-cadherina de la membrana hacia el

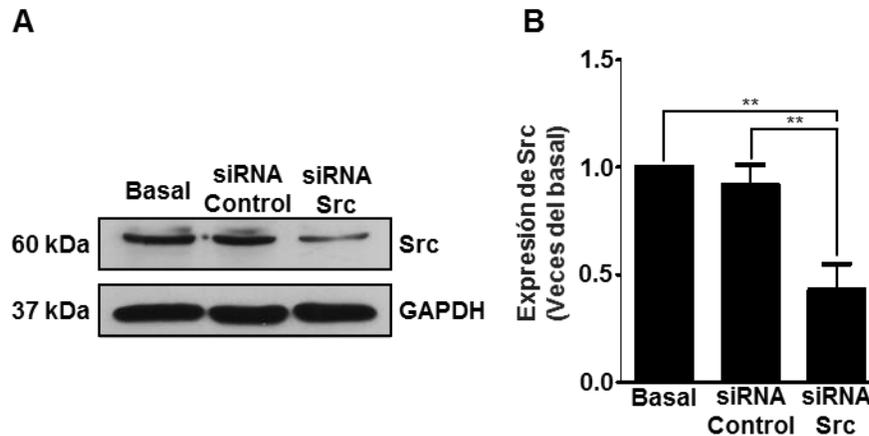
citoplasma. Esta redistribución citoplasmática de E-cadherina no se observó al utilizar los inhibidores PP2 y PP3 mas leptina (Figura 3A). Aunado a esto, los resultados también muestran que tras el estímulo con leptina, ocurre un aumento en la expresión de vimentina y su localización es perinuclear. En contraste, cuando se pretratan los cultivos con PP2 y PP3 mas el estímulo con leptina, la expresión y distribución de vimentina son similares a las células control (Figura 3B). Estos resultados indican que la localización subcelular de E-cadherina y vimentina tras el estímulo con leptina son eventos dependientes de la actividad cinasa de Src en la línea celular MCF10A.





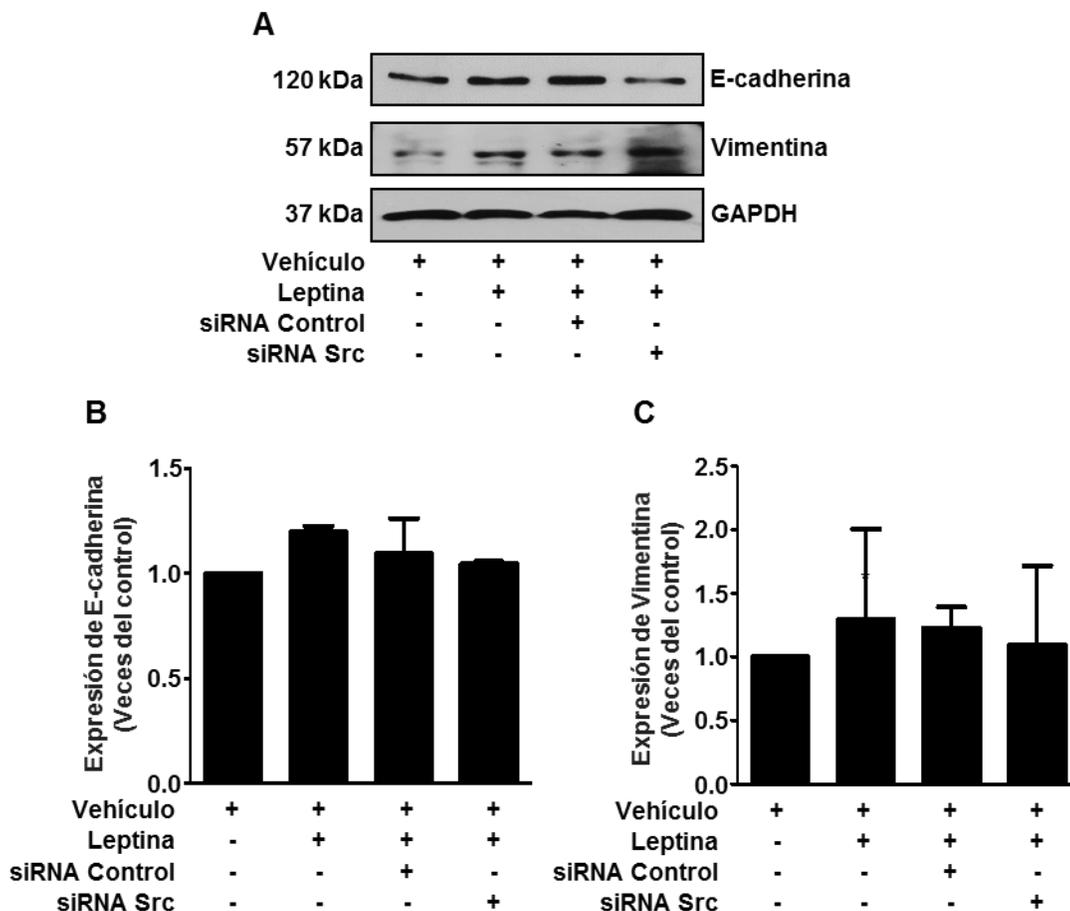
**Figura 3. Src regula la localización subcelular de E-cadherina y vimentina en la línea celular MCF10A estimulada con leptina. Panel A. E-cadherina Panel B. Vimentina.** Inmunofluorescencia de células MCF10A pre-tratadas con 10  $\mu$ M de PP2 o PP3, y tratadas con 400 ng/mL de leptina durante 24 h. Las células se incubaron con anticuerpos específicos para E-cadherina y vimentina, así como con anti-mouse Alexa488 y DAPI, visualizadas a objetivo 100X.

Para evaluar el papel de Src sobre los niveles de expresión de E-cadherina y vimentina en células MCF10A estimuladas con leptina, se realizó adicionalmente el silenciamiento de Src a través de un siRNA específico para Src (siRNA Src), utilizando además un siRNA control sin blanco específico (siRNA Control). Se observó una disminución de la expresión de Src de aproximadamente el 50% tras la transfección con el siRNA Src con respecto al siRNA Control (Figura 4).



**Figura 4. Silenciamiento de Src en la línea celular MCF10A. Panel A.** Las células MCF10A fueron transfectadas con 30 nM del siRNA Control y siRNA Src. La transfección fue evaluada 76 h post-transfección a través de Western blot para Src y GAPDH. 20 µg de proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos para Src y GAPDH. **Panel B.** Gráfica que muestra la densitometría de las bandas en A. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue calculada mediante ANOVA y Newman Keuls. \*\* P < 0.01, células transfectadas con el siRNA Control vs con siRNA Src.

Después del silenciamiento de Src a través de siRNAs, las células fueron estimuladas con leptina. Los resultados muestran que tras el estímulo con leptina, ocurre un incremento en los niveles de E-cadherina y vimentina respecto las células control, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Este resultado es similar en células transfectadas con el siRNA control y estimuladas por leptina (Figura 5A-C). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el silenciamiento de Src promueve la disminución en la expresión de E-cadherina tras la estimulación con leptina (5A y 5B). De manera interesante, se observa que el silenciamiento de Src y la estimulación con leptina promueve el aumento en la expresión de vimentina en esta línea celular (Figura 5A y 5C). Los resultados son representativos dos experimentos independientes y solo muestran tendencias por lo que posteriores experimentos confirmaran este comportamiento.

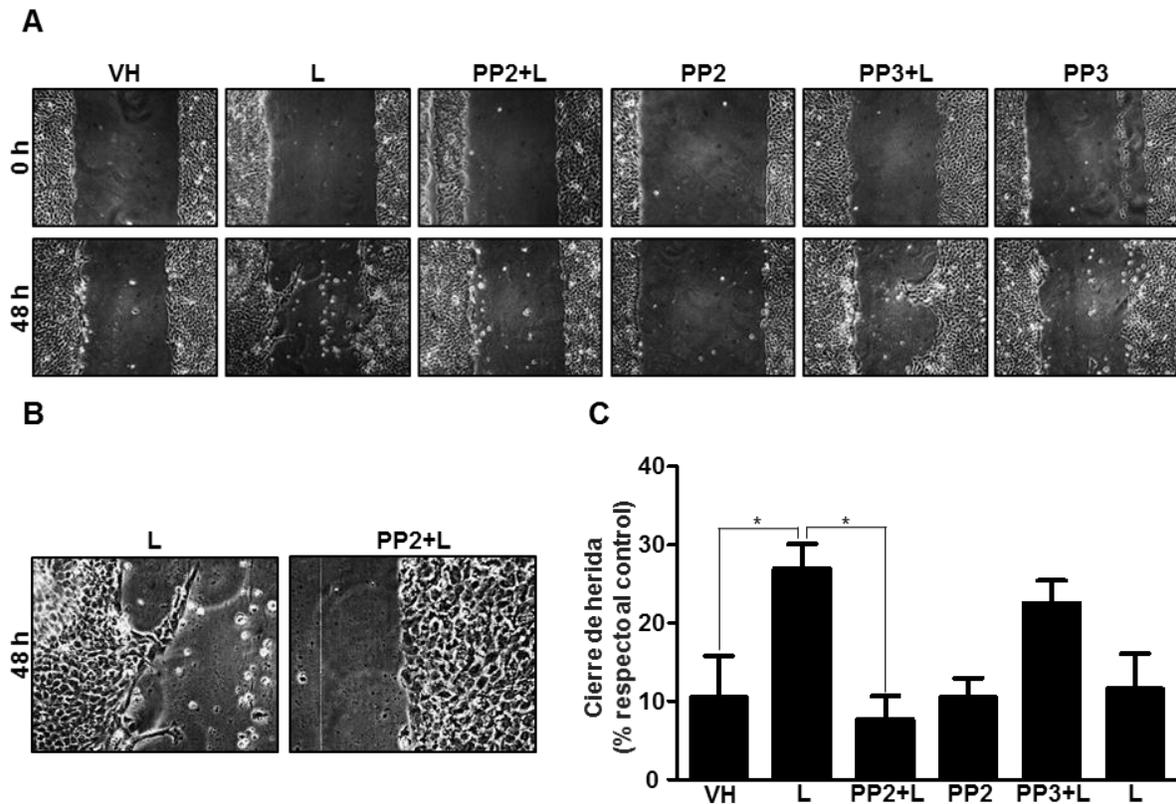


**Figura 5. Silenciamiento de Src en células MCF10A estimuladas con leptina. Panel A.** Las células MCF10A fueron transfectadas con 30 nM del siRNA Control y siRNA Src y 52 h después fueron estimuladas con 400 ng/mL de leptina durante 24 h. 20 µg de proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos para E-cadherina, vimentina y GAPDH. **Panel B y C.** Gráfica que muestra la densitometría de las bandas A. La imagen es representativa de dos experimentos independientes. La significancia estadística fue calculada mediante ANOVA y Newman Keuls.

### La migración celular inducida por leptina es dependiente de la señalización de la cinasa Src en la línea celular MCF10A

Para determinar si la migración celular inducida por leptina en la línea celular MCF10A es dependiente de la señalización de Src, las células MCF10A se sometieron a ensayos de migración por cierre de herida utilizando los inhibidores químicos PP2 y PP3. Los resultados muestran que la migración celular inducida por leptina en la línea celular MCF10A disminuye entre el 20 y 25%, cuando se inhibe la actividad cinasa de Src con PP2. Por otro lado, se observó que la migración celular inducida por leptina no

es afectada al usar el inhibidor PP3 (Figura 6). Estos resultados indican que la leptina induce migración celular en la línea MCF10A de manera dependiente de la actividad cinasa de Src.



**Figura 6. La migración celular inducida por leptina en la línea celular MCF10A es dependiente de la señalización de Src. Panel A.** Migración celular por cierre de herida de la línea MCF10A, estimulada con vehículo de leptina (control, células no tratadas), leptina (400 ng/mL), leptina (400 ng/mL) más PP2 o PP3 (10 $\mu$ M) y PP2 o PP3 (10 $\mu$ M). **Panel B.** La gráfica muestra el porcentaje de cierre de herida para cada condición. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue calculada mediante ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls. \*P<0.05 vs células estimuladas con leptina.

## Discusión

Diversos estudios clínicos y experimentales muestran que la leptina es una adipocina con funciones endocrinas, paracrinas y autocrinas, en el desarrollo y progresión del CaMa (Garofalo 2006; Giordano 2016; Hosney *et al.*, 2017). En modelos experimentales de CaMa, la leptina es un inductor de procesos relacionados con el cáncer como la proliferación y la transformación maligna, siendo la EMT uno de los más importantes ya que permite la adquisición de un fenotipo migratorio e invasivo de las células cancerosas (Yan *et al.*, 2012, Tomaskovic-Crook *et al.*, 2009). La EMT inducida por leptina se ha caracterizado en líneas celulares de CaMa como MCF7, SK-RB-3 y MDA-MB-231 (Yan *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2017). Recientemente se reportó que la leptina induce EMT de tipo parcial en células MCF10A de epitelio mamario no tumoral (Villanueva-Duque *et al.*, 2017). Sin embargo, los mecanismos moleculares y las implicaciones biológicas de este tipo de EMT, no han sido totalmente caracterizados.

Diversos reportes han asociado a la cinasa Src como una proteína de señalización importante en la adquisición de características mesenquimales en CaMa (Liu & Feng, 2010; Sánchez-Bailón *et al.*, 2012). La activación de Src se correlaciona con procesos metastásicos y con la adquisición de un fenotipo invasivo y migratorio en modelos de CaMa. Debido a esto, en este estudio se evaluó el efecto de la leptina sobre los niveles de activación de la cinasa Src, mediante la determinación de la fosforilación de la Y419. En este modelo experimental se observó que leptina induce la activación de la cinasa Src a los 5 min de estimulación. En este sentido, los mecanismos de activación de la cinasa Src por el Ob-R no están del todo entendidos, sin embargo, existe evidencia experimental que sugiere que la activación de Src a tiempos cortos, podría involucrar interacción directa de Src con el Ob-R, probablemente del dominio SH2 de Src a tirosinas fosforiladas de este receptor (Jiang *et al.*, 2008; Heida *et al.*, 2010). Aunado a esto, no se descarta un mecanismo de activación que involucre la participación de moléculas río abajo de la señalización del Ob-R como JAK y PTP1B (Heida *et al.*, 2010; Arias-Romero *et al.*, 2009). En nuestro modelo de estudio se ha descrito que leptina induce la activación del EGFR a través

de un mecanismo de transactivación, en este sentido, la activación de Src a los 30 minutos podría estar relacionado con la interacción directa de Src con el EGFR (Belsches-Jablonski *et al.*, 2001; Bello-Ríos, 2016). Por otro lado, la disminución en la activación de Src podría involucrar la participación de fosfatasa de tirosinas dirigidas a la Y419 de Src y cinasas como Csk dirigida a la Y530 de Src que permiten la inactivación de Src. Ambas condiciones promueven una conformación de autoinhibición a través de sus dominios SH2 y SH3 (Fan *et al.*, 2015).

Se ha descrito que la EMT se acompaña de la pérdida de marcadores epiteliales y ganancia de marcadores mesenquimales adquiriendo un fenotipo totalmente mesenquimal (Kalluri & Weinberg, 2009). No obstante, actualmente se ha descrito que existe un fenotipo híbrido o parcial de la EMT, que se caracteriza por el mantenimiento de E-cadherina, e incremento de marcadores mesenquimales como vimentina, manteniendo el fenotipo epitelial y un comportamiento migratorio de tipo colectivo (Bill & Christofori, 2015; Jolly *et al.* 2015). Se ha descrito que los niveles totales de E-cadherina se mantienen y que se observa cambio en la localización subcelular durante el proceso de EMT de tipo parcial inducida por leptina en células MCF10A (Villanueva-Duque *et al.*, 2017). En este contexto, se determinó el papel de la cinasa Src sobre la expresión de E-cadherina en células MCF10A estimuladas con leptina. En este estudio se observó que la expresión de E-cadherina inducida por leptina es dependiente de la actividad cinasa de Src. Esta expresión dependiente de la actividad de Src podría relacionarse con procesos de regulación transcripcional mediados de manera indirecta por esta cinasa. Aunque pocos estudios describen un aumento en la expresión de E-cadherina tras el estímulo con leptina, se ha descrito en células MCF7 que el estímulo con leptina potencia la señalización de ER $\alpha$ , e induce la interacción de CREB y SP1 al promotor de E-cadherina, potenciando la transcripción de este gen a través de una vía dependiente de ERK y ER $\alpha$  respectivamente (Catalano *et al.*, 2004; Mauro *et al.*, 2007). Aunque no se ha reportado la participación de Src en mecanismos de activación transcripcional mediados por ERK y ER $\alpha$ , no se descarta el entrecruzamiento de estas vías en el aumento en la expresión de E-cadherina inducida por leptina (Kousteni *et al.*, 2003; Villanueva-Duque *et al.*, 2017). Además, nuestros resultados muestran que leptina induce la relocalización de E-cadherina de la membrana plasmática al

citoplasma a través de un proceso dependiente de la actividad cinasa de Src. La relocalización de E-cadherina inducida por leptina, podría involucrar la interacción directa o indirecta entre Src y E-cadherina. Esto debido a que se ha reportado en otros modelos celulares, que Src forma complejos con E-cadherina y  $\beta$ -catenina, además de colocalizar con estas proteínas en las uniones adherentes (Wei *et al.*, 2008; Veracini *et al.*, 2015). Además se ha reportado que el ensamblaje y desensamblaje de estas uniones adherentes mediadas por E-cadherina, se relacionan con la actividad cinasa de Src (Kourtidis *et al.*, 2015; Rötzer *et al.*, 2015; Veracini *et al.*, 2015). Con base en esto, no se descarta que este proceso de mantenimiento de E-cadherina durante la EMT de tipo parcial inducida por leptina, se relacione con procesos de regulación a nivel de membrana a través de la actividad cinasa de Src.

Vimentina es un filamento intermedio y un marcador clásico de células mesenquimales. Durante el proceso de EMT de tipo parcial inducida por leptina en células MCF10A se ha descrito el incremento de esta proteína (Villanueva-Duque *et al.*, 2017). En el presente estudio se observa que leptina aumenta la expresión de vimentina de manera dependiente de la actividad cinasa de Src. Los mecanismos que regulan el aumento en la expresión de vimentina podrían involucrar procesos de regulación transcripcional mediados de manera indirecta por Src. En este sentido se ha descrito que STAT3 induce la expresión de vimentina, al interactuar con proteínas represoras de la transcripción como ZBP-89 (Wu *et al.*, 2004). Si bien, STAT3 es una proteína activada durante la señalización de leptina a través de JAK, se ha descrito en otros modelos celulares que leptina induce la activación de este factor transcripcional dependiente de Src e independiente de JAK (Jiang *et al.*, 2008). Interesantemente se ha descrito en otros modelos celulares que la activación de STAT3 y la expresión de JAK, así como de vimentina son dependientes de Src (Teneale *et al.*, 2016). Con base en estos antecedentes, la regulación transcripcional de vimentina podría estar relacionados con Src y la activación de STAT3 en este modelo celular. Además, se ha reportado que  $\beta$ -catenina tiene funciones dependientes de la localización subcelular, ya sea como proteína estructural a nivel de membrana a través de la interacción con el complejo de adhesión celular E-cadherina/p120/ $\gamma$ - $\beta$ -catenina/ $\alpha$ -catenina o como activador transcripcional a nivel de núcleo a través la interacción con el complejo de

transcripcional TCF/LEF, que permite la transcripción de genes como vimentina (Wijnhoven *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2012). Evidencias indican que Src puede interactuar con  $\beta$ -catenina y fosforilar sitios en tirosina relacionados con la separación de esta molécula de complejos de adhesión celular regulados por E-cadherina (Veracini *et al.*, 2015; Rötzer *et al.*, 2015). Recientemente se informó que  $\beta$ -catenina es una proteína relacionada con la EMT inducida por leptina en células MCF7 (Yan *et al.*, 2012). Con base en esta evidencia y los resultados obtenidos en este estudio, la relocalización de E-cadherina a través de Src, sugiere una mayor biodisponibilidad de  $\beta$ -catenina y la posterior relocalización de membrana a núcleo promoviendo la transcripción del gen de vimentina. En paralelo, los resultados obtenidos por inmunofluorescencia, muestran una distribución de los filamentos de vimentina de manera perinuclear dependientes de la actividad cinasa de Src. Esta redistribución implica la interacción de vimentina con proteínas del citoesqueleto como los microtúbulos proporcionándoles estabilidad y direccionalidad de las células en los procesos de migración celular (Gan *et al.*, 2016).

El inhibidor químico PP2 es ampliamente usado como un inhibidor específico de Src por su alta afinidad al sitio de unión de ATP del dominio cinasa. De manera interesante, en este estudio se observó que PP3, un análogo inactivo de PP2, tiene un efecto similar al inhibidor PP2 sobre los niveles de expresión de E-cadherina y vimentina inducidos por leptina. Este comportamiento podría ser explicado por el efecto a largo plazo del PP3 como inhibidor de la actividad cinasa del EGFR (Kong *et al.*, 2011). El EGFR es un receptor implicado en la EMT a través de procesos de transactivación por diversos estímulos y adicionalmente se ha caracterizado que leptina puede inducir un proceso de transactivación del EGFR de manera dependiente de Src en este modelo experimental (Saxena *et al.*, 2008; Lindsey & Langhans 2015; Bello-Ríos, 2016). Con base en esto, el efecto del inhibidor PP3 en este modelo experimental, podrían estar relacionado con un efecto río abajo de la activación de Src a través de la inhibición cinasa del EGFR.

Además de la actividad cinasa, Src presenta dominios esenciales para la interacción con moléculas de señalización, siendo el dominio SH2 y SH3 los más importantes. Estos dominios permiten que Src interactúe con proteínas independientemente de su actividad cinasa y posiblemente regulen la función de Src

como una proteína adaptadora en la señalización de diversas vías. En este contexto, también se evaluó el papel de Src en la regulación de marcadores clásicos de la EMT inducidos por leptina, mediante ensayos de silenciamiento de Src. En paralelo con los datos obtenidos con el inhibidor químico, la expresión de Src parece ser indispensable para el aumento en la expresión de E-cadherina inducida por leptina. Contrario a los datos obtenidos con el inhibidor PP2, la expresión de Src no parece ser indispensable para el aumento en la expresión de vimentina inducida por leptina. Este comportamiento podría estar relacionado con el incremento en la expresión y/o activación de diversas cinasas de la familia Src como Fgr, Fyn y Lyn que podrían compensar la función de Src cuando sus niveles proteicos están disminuidos en esta línea celular, como se ha reportado en células de cáncer ovárico (Kim *et al.*, 2011).

La migración colectiva, se ha reportado como un tipo de migración en la EMT de tipo parcial inducida por leptina en células MCF10A (Villanueva-Duque *et al.*, 2017). En este estudio se observó que la migración de tipo colectivo es dependiente de la actividad cinasa de Src. En modelos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se ha descrito la participación activa de Src en migración celular de tipo colectivo (Veracini *et al.*, 2015). La migración de tipo colectivo es una migración que se caracteriza por el mantenimiento de las uniones célula-célula manteniendo un fenotipo epitelial y en este sentido también se ha descrito que este tipo de migración depende en E-cadherina (Chen *et al.*, 2014). Evidencias recientes indican la participación activa de Src en la migración celular de tipo colectivo a través de la dinámica de localización subcelular de E-cadherina y de los complejos del cual forma parte (Baumgartner *et al.*, 2008; Kourtidis *et al.*, 2015; Rötzer *et al.*, 2015; Veracini *et al.*, 2015). Estos hallazgos sugieren que la participación de Src en este tipo de migración, podrían estar relacionado con regulación dinámica y mantenimiento de E-cadherina a nivel de membrana. Estudios knockdown o knockout de E-cadherina podrán determinar si este tipo de migración y el fenotipo parcial de EMT inducido por leptina es regulado por E-cadherina, Src y proteínas relacionadas con el fenotipo mesenquimal. Se ha descrito que la migración celular inducida por leptina también es dependiente de la señalización del EGFR (Bello-Ríos, 2016). En este estudio el inhibidor PP3 no afecta la migración celular inducida por leptina, a pesar de que el efecto a largo plazo del inhibidor pueda

afectar la señalización del EGFR y la expresión de proteínas de EMT. El efecto de PP3 sobre el EGFR no es suficiente para disminuir el proceso migratorio inducido por leptina, lo cual explica mecanismos de señalización alternos de este tipo de migración celular inducido por leptina en células MCF10A.

El éxito de la metastásis de células cancerosas mamarias, se atribuye a la adquisición de un fenotipo migratorio e invasivo, por el programa de EMT. Aunado a esto la EMT involucra la adquisición de resistencia a la anoikis, quimioterapia y a la respuesta inmune, particularmente por el patrón de expresión de proteínas de membrana en estas células (Bill & Christofori, 2015). No obstante, la EMT de tipo parcial y el comportamiento migratorio colectivo se caracteriza molecularmente por conservar los niveles de E-cadherina y expresión de marcadores mesenquimales como vimentina y Twist (Cheung *et al.*, 2013; Bill & Christofori, 2015). Debido a que este tipo de migración asegura un mayor número de células en el proceso invasivo, se propone como un mecanismo celular para la diseminación de células cancerosas a nivel local y sistémico por una mayor sobrevivencia a nivel de circulación sanguínea (Bill & Christofori, 2015; Grigore *et al.*, 2016). Dada la heterogeneidad celular inducida por el microambiente tumoral, este tipo de migración colectiva también permite la liberación de células individuales a nichos metastásicos que aseguran la diseminación tumoral (Haeger *et al.*, 2014; Bill & Christofori, 2015). Sin embargo, los mecanismos moleculares e inductores de este fenotipo en CaMa no están del todo caracterizados. En resumen los resultados obtenidos en este estudio indican que leptina induce la expresión de marcadores de EMT y el comportamiento migratorio de tipo colectivo a través de una vía dependiente de la cinasa Src en células MCF10A.

## **Conclusiones**

Leptina induce la activación de la cinasa Src en células de epitelio mamario no tumoral MCF10A.

Leptina regula los niveles de expresión y localización subcelular de E-cadherina y vimentina a través de una vía dependiente de la cinasa Src en células de epitelio mamario no tumoral MCF10A.

Leptina induce migración celular de tipo colectivo a través de una vía dependiente de la cinasa Src en células de epitelio mamario no tumoral MCF10A.

## Referencias

**Haeger, A., Krause, M., Wolf, K., & Friedl, P.** (2014). Cell jamming: collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1840(8), 2386-2395

**Anbalagan, M., Moroz, K., Ali, A., Carrier, L., Glodowski, S. & Rowan, BG.** (2012). Subcellular localization of total and activated Src kinase in African American and Caucasian breast cancer. *PLoS One*, 7(3), e33017.

**Arias-Romero, L. E., Saha, S., Villamar-Cruz, O., Yip, S. C., Ethier, S. P., Zhang, Z. Y., & Chernoff, J.** (2009). Activation of Src by Protein Tyrosine Phosphatase-1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells. *Cancer Research*, 69(11), 4582–4588.

**Baumgartner M., Radziwill G., Lorgner M., Weiss A. & Moelling K.** (2008) c-Src-mediated epithelial cell migration and invasion regulated by PDZ binding site. *Molecular and Cellular Biology*, 28(2), 642-55.

**Bello-Ríos, C.** Transición Epitelio-Mesenquimal inducida por leptina en células MCF10A: Transactivación del EGFR e invasión celular. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias Biomédicas. Chilpancingo de los Bravo, Gro. Posgrado Maestría en Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Guerrero; 2016

**Belsches-Jablonski, A. P., Biscardi J. S., Peavy D.R., Tice D.A., Romney D.A., & Parsons S.J.** (2001) Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene*, 20(12), 1465-75.

**Bill, R. & Christofori, G.** (2015). The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? *FEBS Letters*, 589(14):1577-87.

**Catalano S., Mauro L., Marsico S., Giordano C., Rizza P., Rago V., et al.** (2004). Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (19),19908-15.

**Chen, A., Beetham, H., Black, M., Priya, R., Telford, B., Guest, J., et al.** (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.

**Dave, J.M., & Bayless, K.J.** (2014). Vimentin as an Integral Regulator of Cell Adhesion and Endothelial Sprouting. *Microcirculation*, 21(4), 333-44.

**Di Florio A., Capurso G., Milione M., Panzuto F., Geremia R., Delle Fave G., et al.** (2007). Src family kinase activity regulates adhesion, spreading and migration of pancreatic endocrine tumour cells. *Endocrine-Related Cancer*, 14(1), 111-24.

**Elsberger B., Fullerton R., Tan B., Mitchell T. & Edwards J.** (2009). High expression of Src kinase family members (SKFMs) in breast cancer specimens and their association to patients' clinical outcome. *Surgical Oncology*, 35(11), 1237.

**Fan, G., Aleem, S., Yang, M., Miller, W. T., & Tonks, N. K.** (2015). Protein-tyrosine Phosphatase and Kinase Specificity in Regulation of SRC and Breast Tumor Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(26), 15934–15947.

**Frühbeck G.** (2006). Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*, 393 (Pt 1), 7-20.

**Gan, Z., Ding, L., Burckhardt, C.J., Lowery, J., Zaritsky, A., Sitterley, K., et al.** (2016). Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Systems*, 3(3), 252-263.e8.

**Garofalo C., Koda M., Cascio S., Sulkowska M., Kanczuga K., Golaszewska J., et al.,** (2006). Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clinical Cancer Research*, 12(5), 1447-1453.

**Gilles C., Polette M., Mestdagt M., Nawrocki-Raby B., Ruggeri P., Birembaut P., et al.** (2003). Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 63(10), 2658-64.

**Giordano, C., Chemi, F., Panza, S., Barone, I., Bonofiglio, D., Lanzino, M., et al.** (2016). Leptin as a mediator of tumor-stromal interactions promotes breast cancer stem cell activity. *Oncotarget*, 7(2), 1262–1275.

**González L., Agulló-Ortuño MT., García-Martínez JM., Calcabrini A., Gamallo C., Palacios J., et al.** (2006) Role of c-Src in human MCF7 breast cancer cell tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 20851-64.

**Grigore, A. D., Jolly, M. K., Jia, D., Farach-Carson, M. C., & Levine, H.** (2016). Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal of Clinical Medicine*, 5(5), 51.

**Guo S., Liu M., Wang G., Torroella-Kouri M. and Gonzalez-Perez R.R.** (2012). Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825(2), 207-22.

**Heida N., Leifheit-Nestler M., Schroeter M., Müller J., Cheng I., Henkel S. et al.** (2010). Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via src kinase and integrin (alpha)vbeta5: implications for angiogenesis in human obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2), 200-206.

**Hosney, M., Sabet, S., El-Shinawi, M., Gaafar, K. M., & Mohamed, M. M.** (2017). Leptin is overexpressed in the tumor microenvironment of obese patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(5), 2235–2246.

**Jiang, L., Li, Z., & Rui, L.** (2008). Leptin Stimulates Both JAK2-dependent and JAK2-independent Signaling Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28066-28073.

**Jolly, M. K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Ben-Jacob, E., et al.** (2015). Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 5, 155.

**Cheung, K. J., Gabrielson E., Werb Z., & Ewald A.J.** (2013). Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*, 155(7), 1639-1651.

**Kalluri, R. & Weinberg, R.** (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119 (6), 1420-1428.

**Kong L., Deng Z., Shen, H. & Zhang, Y.** (2011). Src family kinase inhibitor PP2 efficiently inhibits cervical cancer cell proliferation through down-regulating phospho-Src-Y416 and phospho-EGFR-Y1173. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 348(1-2), 11-9.

**Kourtidis, A, Ngok S.P., Pulimeno, P., Feathers, R.W., Carpio, L.R, Baker, T.R., et al.** (2015). E-cadherin-based complexes regulate cell behaviour through miRNA processing or Src and p120 catenin activity. *Nature Cell Biology*, 17(9),1145-57.

**Kousteni S., Han L., Chen JR., Almeida M., Plotkin L.I., Bellido T., et al.** (2003). Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-

protective effects of sex steroids. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(11), 1651-64.

**Lindsey, S. & Langhans, S. A.** (2015). Epidermal growth factor signaling in transformed cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 314, 1-41.

**Liu C.Y., Lin H.H., Tang M.J. & Wang Y.K.** (2015). Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6(18), 15966–15983.

**Liu X. & Feng R.** (2010). Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic breast carcinoma cells by c-Src suppression. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(7), 496–501.

**Mauro L., Catalano S., Bossi G., Pellegrino M., Barone I., Morales S., et al.,** (2007). Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression. *Cancer Research*, 67(7), 3412-3421.

**Mishra A., Parish C., Wong M., Licinio J. & Blackburn A.** (2017). Leptin signals via TGFB1 to promote metastatic potential and stemness in breast cancer. *PLoS One*, 12(5), e0178454.

**Mohammadzadeh G., Ghaffari MA., Bafandeh A. & Hosseini S. M.** (2014). Association of serum soluble leptin receptor and leptin levels with breast cancer. *Journal of Research in Medical Sciences*, 19(5), 433-438.

**Moyret-Lalle, C., Ruiz, E. & Puisieux, A. P.** (2014). Epithelial-mesenchymal transition transcription factors and miRNAs: “Plastic surgeons” of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 311-322.

**Nam J. S., Ino Y., Sakamoto, M. & Hirohashi, S.** (2002). Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*, 8(7), 2430-2436.

**Roskoski, JrR.** (2015). Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule Inhibitors. *Pharmacological Research*, 94, 9-25.

**Rötzer, V., Hartlieb, E., Vielmuth, F., Gliem, M., Spindler, V. & Waschke, J.** (2015). E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(24), 4885-4897.

**Sánchez-Bailón MP., Calcabrini A., Gómez-Domínguez D., Morte B., Martín-Forero E., Gómez-López G., et al.** (2012). Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Signaling*, 24(6), 1276-86.

**Saxena, N. K., Taliaferro-Smith, L., Knight, B. B., Merlin, D., Anania, F. A., O'Regan, R. M., et al.** (2008). Bidirectional Crosstalk between Leptin and Insulin-like Growth Factor-I Signaling Promotes Invasion and Migration of Breast Cancer Cells via Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Research*, 68(23), 9712-9722.

**Tamiya S. & Delamere N.** (2005) Studies of Tyrosine Phosphorylation and Src Family Tyrosine Kinases in the Lens Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(6); 2076-2081.

**Tomaskovic-Crook, E., Thompson, E. W., & Thiery, J. P.** (2009). Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 11(6), 213. 5(2). pii: E13.

**Tsai JH. & Yang J.** (2015). Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & Development*, 27(20), 2192-206.

**van Roy F. & Berx G.** (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(23), 3756-3788.

**Veracini L., Grall D., Schaub S., Beghelli-de la Forest Divonne S., Etienne-Grimaldi MC., Milano G., et al.** (2015). Elevated Src family kinase activity stabilizes E-cadherin-based junctions and collective movement of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget*, 10; 6(10), 7570-7583.

**Villanueva-Duque A., Zuniga M. D., Dena-Beltran J., Castaneda-Saucedo E., Calixto-Galvez M., Mendoza-Catalán M.A., et al.** (2017). Leptin induces partial epithelial-mesenchymal transition in a FAK-ERK dependent pathway in MCF10A mammary non-tumorigenic cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(10), 10334-10342.

**Wei, J., Xu, G., Wu, M., Zhang, Y., Li, Q., Liu, P., et al.** (2008). Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. *Anticancer Research*, 28(1A), 327-334.

**Wei L., Li K., Pang X., Guo B., Su M., Huang Y., Chen, T. et al.** (2016). Leptin promotes epithelial-mesenchymal transition of breast cancer via the upregulation of pyruvate kinase M2. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, CR, 35, 166.

**Wu Y., Diab I., Zhang X., Izmailova E. & Zehner Z.** (2004). Stat3 enhances vimentin gene expression by binding to the antisilencer element and interacting with the repressor protein, ZBP-89. *Oncogene*, 23(1), 168-178.

**Yan, D., Avtanski, D., Saxena, N. K. & Sharma, D.** (2012). Leptin-induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells Requires-Catenin Activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 Protein-dependent Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8598–8612.

**Yeatman, T. J.** (2004). A renaissance for SRC. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 470-80.

**Zeisberg M. & Neilson E.G.** (2009). Biomarkers for epithelial mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation*, 119 (3), 1429-1437.