



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 en la invasión celular durante la transición
epitelio-mesenquimal en células mamarias MCF10A
estimuladas con leptina**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Biomédicas**

P R E S E N T A:

Q.B.P. Francisco Yovani Vargas Santiago

DIRECTOR: Dr. Napoleón Navarro Tito

CODIRECTOR: Dr. Carlos Ortuño Pineda



Chilpancingo de los Bravo Gro. Septiembre del 2018.



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 18 días del mes de junio de dos mil dieciocho 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 en la invasión celular durante la transición epitelio-mesenquimal en células mamarias MCF10A estimuladas con leptina**”, presentada por el alumno Francisco Yovani Vargas Santiago, 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

Dr. Donaciano Flores Robles

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán

Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas

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

Vo. Bo

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

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, en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero México.

Bajo la dirección de

Dr. Napoleón Navarro Tito

Codirección

Dr. Carlos Ortuño Pineda

La asesoría de

Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Donaciano Flores Robles

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. Francisco Yovani Vargas Santiago, recibió beca del CONACYT con número de registro CVU 777213.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres, familiares y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Napoleón Navarro Tito, por la confianza y apoyo en la realización de este proyecto y a mis sinodales por su asesoría. Gracias a mi coordinadora de seminario de investigación, la Dra. Eugenia Flores Alfaro y a los integrantes del Laboratorio de Biología Celular del Cáncer.

Gracias a mis mejores amigos Teo, Erika, Jonathan, Fernanda y a todos mis compañeros de la generación 2016-2018 de la Maestría en Ciencias Biomédicas.

CONTENIDO

I.- RESUMEN	4
II.- ABSTRACT	5
III.- INTRODUCCIÓN	6
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
V.- RESULTADOS	12
VI.- DISCUSIÓN	16
VII.- CONCLUSIÓN.....	19
VIII.- REFERENCIAS.....	20

I.- RESUMEN

Antecedentes: La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama, debido a que la acumulación excesiva de tejido adiposo trae como consecuencia una alta síntesis de estrógenos y adipocinas que promueven la progresión tumoral. La leptina es una de las principales adipocinas secretadas en el tejido mamario y ha sido asociada con la metástasis del cáncer. Durante la metástasis es necesaria la activación de procesos biológicos como la transición epitelio-mesenquimal, que favorece la migración e invasión de las células cancerosas. Recientemente se demostró que la leptina promueve la migración e invasión en células MCF10A, a través de la EMT. Sin embargo, el mecanismo molecular que subyace a este evento no está bien descrito. En otros modelos de estudio se ha documentado la participación de cinasas que regulan vías de señalización que activan la EMT y una de las más estudiadas debido a su potencial oncogénico es la cinasa Src. **Objetivo:** Evaluar el papel de Src en procesos relacionados con la invasión en células MCF10A estimuladas con leptina. **Metodología:** Para evaluar el papel de Src en procesos de invasión inducidos por leptina, se utilizó el inhibidor químico PP2. Para evaluar la secreción de la MMP-2 y MMP-9, se realizaron ensayos de zimografía en gelatina. Se utilizó una matriz de gelatina marcada para determinar la formación de invadopodios y una cámara *Transwell* para evaluar la invasión celular *in vitro*. **Resultados:** La leptina promueve la secreción de la MMP-2 y MMP-9, formación de invadopodios e invasión celular en las células MCF10A y estos eventos disminuyen en presencia de PP2. **Conclusiones:** Leptina promueve la secreción de la MMP-2, MMP-9, la formación de invadopodios e invasión celular en células MCF10A de manera dependiente de la cinasa Src.

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

II.- ABSTRACT

Background: Obesity is a risk factor for the development of breast cancer, due to the excessive accumulation of adipose tissue, which results in a high synthesis of estrogens, and adipokines that promote tumor progression. Leptin is one of the main adipokines secreted in breast tissue and it has been associated with metastasis of tumor cells. Epithelial-mesenchymal transition is a biological process involved in cell migration and invasion of cancer cells. Recently it was demonstrated that leptin promotes cell migration and invasion in MCF10A cells, through EMT activation. However, the molecular mechanism underlying this event is not well described. Furthermore, it has been reported the participation of kinases that regulate signaling pathways that activate the EMT such as Src, a tyrosine kinase related to a high oncogenic potential. **Objective:** To evaluate the role of Src in processes related to invasion in MCF10A cells stimulated with leptin. **Methodology:** To evaluate the role of Src in leptin-induced invasion processes, the chemical inhibitor PP2 were used. To evaluate the secretion of MMP-2 and MMP-9, gelatin zymography assays were performed. A Alexa-488-labeled gelatin was used to determine the invadopodia formation and a *Transwell* chamber to evaluate cell invasion *in vitro*. **Results:** We found that leptin promotes the secretion of MMP-2 and MMP-9, invadopodia formation and invasion in MCF10A cells and these events decrease with PP2. **Conclusions:** Leptin promotes secretion of MMP-2, MMP-9, invadopodia formation and cell invasion in MCF10A cells in a Src kinase dependent manner.

Keywords: Obesity, Breast cancer, Leptin, EMT, Src.

III.- INTRODUCCIÓN

La Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) es un proceso de transdiferenciación celular en el cual una célula epitelial adquiere un fenotipo mesenquimal. Durante la EMT, las células epiteliales experimentan pérdida de las uniones adherentes y de la polaridad apical-basal, reorganización del citoesqueleto, alteración de la expresión génica y cambios en los programas de señalización celular relacionados con el incremento de la motilidad de las células y el desarrollo de un fenotipo invasivo (Lamouille *et al.*, 2014). Los cambios fenotípicos que caracterizan la EMT son consecuencia de la pérdida de marcadores epiteliales como E-cadherina, desmoquina, ocludina, claudina y citoqueratinas, así como ganancia de marcadores mesenquimales como N-cadherina, vimentina, metaloproteasas de matriz (MMPs) y expresión de factores de transcripción relacionados con esta transición como ZEB1 / 2, Snail1, Slug y TWIST1 / 2 (Froni *et al.*, 2012; Min *et al.*, 2008; Zeisberg & Neilson, 2009). La EMT ocurre de forma fisiológica en procesos como la embriogénesis y regeneración de tejidos; sin embargo, cuando ocurre en células epiteliales cancerosas contribuye a la progresión tumoral, resistencia terapéutica, desarrollo de células troncales cancerosas, invasión y metástasis (De Crane & Berx, 2013; Kalluri & Weinberg 2009; Sato *et al.*, 2016). Recientemente se ha demostrado que leptina promueve la EMT en células epiteliales mamarias, a través del complejo de cinasas FAK/ERK, aumenta la expresión de vimentina y cambios en la localización subcelular de E-cadherina de las uniones intercelulares al citoplasma, favoreciendo la migración celular de tipo colectiva (Villanueva-Duque *et al.*, 2017).

Leptina es una hormona de 16 kD, codificada por el gen *OB*, es producida y secretada principalmente por el tejido adiposo, y tiene como funciones principales el control de la saciedad, el gasto de energía y la ingesta de alimentos (Schmidt *et al.*, 2015). En las personas obesas hay una mayor expresión del mRNA del gen de leptina y existe una fuerte correlación entre la obesidad y la concentración de leptina en plasma (Niu *et al.*, 2013). Leptina ejerce su acción uniéndose a su receptor OB-R, responsable de la regulación de las vías de señalización mediadas por esta hormona. En el tejido mamario leptina favorece el desarrollo de la glándula mamaria;

sin embargo, su sobreexpresión puede conducir a condiciones fisiopatológicas como el desarrollo y progresión del cáncer de mama, debido a la sobre activación de vías de señalización implicadas en la carcinogénesis como JAK2 / STAT3, MAPK y PI3K/AKT (Schmidt *et al.*, 2015; Zhou & Rui, 2014).

La invasión celular es un proceso relacionado con la EMT, que implica la degradación de la matriz extracelular (ECM) por la célula tumoral, permitiendo su infiltración al tejido adyacente (Yilmaz & Christofori, 2009). Los invadopodios son estructuras de membrana ricas en actina que desempeñan un papel importante durante la invasión, debido a su actividad catalítica en los sitios de contacto con la membrana basal (Weaver, 2006). Por otro lado, existe evidencia que sugiere que la gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9) están involucradas en el inicio y progresión del cáncer de mama a través de la activación por escisión o degradación de proteínas implicadas en la angiogénesis, invasión y metástasis, como colágenas, FGF, TGF- α , entre otras (Duffy *et al.*, 2000); además se han relacionado con la etapa invasiva de carcinomas debido a que se caracterizan por su capacidad de degradar gelatina y colágeno de tipo IV, principales componentes en la membrana basal (Duffy *et al.*, 2000), esto se ha correlacionado con una mayor actividad de las MMP-2 y MMP-9 en suero y tejido de pacientes con cáncer de mama en comparación con pacientes sanos (La Rocca *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2009). En líneas celulares de cáncer de mama, se ha reportado que la secreción de las MMP-2 y MMP-9 es dependiente de una vía de señalización mediada por la cinasas Src (Rendon-Nava & Petronilo Navarrete, 2015).

Src es una tirosina cinasa de 60 kD, que desempeña un papel importante en una variedad de vías de transducción de señales celulares, regulando procesos como la división celular, la motilidad, la adhesión, la angiogénesis y la supervivencia (Summy & Gallick., 2003). Src es un efector importante de la EMT, ya que puede controlar la integridad de las uniones adherentes y puede contribuir significativamente al desarrollo y la remodelación de las diferentes estructuras de adhesión célula-sustrato. Src es crucial durante la metástasis tumoral, debido a su papel en la regulación del citoesqueleto, la migración celular, la adhesión y la invasión (Finn.,

2008). Src interactúa con receptores tirosina cinasa transmembranales (RTK) en la membrana celular, a través de sus dominios SH2 y SH3. La interacción de Src con EGFR, HER2, PDGFR, IGF-R y HGFR, promueve su activación por fosforilación de la Tyr-419 de Src, localizada en su dominio cinasa, en consecuencia, favorece la señalización RTK y transducción de señales de supervivencia a efectores río abajo como PI3K, Akt y STAT3. Diversos estudios han demostrado que la expresión y actividad de Src es mayor en carcinomas mamarios en comparación con el tejido mamario normal y que esto se relaciona positivamente con el estadio del cáncer (Elsberger *et al.*, 2009; Zhang & Yu., 2012).

Investigaciones recientes en células epiteliales mamarias MCF10A, demuestran que leptina promueve la EMT de tipo parcial, induce migración de tipo colectiva e invasión celular, sin embargo no se ha demostrado la participación de Src en estos eventos (Villanueva-Duque *et al.*, 2017). Por lo tanto, nos preguntamos si la invasión celular durante la EMT activada por leptina, pueden ser regulada por Src. Nuestros resultados muestran que leptina promueve la secreción de la MMP-2 y MMP-9, formación de invadopodios e invasión celular en células epiteliales mamarias MCF10A y que estos eventos se llevan a cabo de manera dependiente de la cinasa Src.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

Material y reactivos

El medio DMEM/F12, EGF, Hidrocortisona, insulina, leptina, PP2, gelatina bovina, matrigel, Fluorosheld DAPI y la Faloidina-TRITC fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El Suero Fetal Bovino (SFB) de BYProductos (Guadalajara, MX). El anticuerpo específico para GAPDH acoplado a peroxidasa, fue obtenido de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Los antibióticos y gelatina marcada con Alexa Fluor 488 se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Las cámaras *Transwell* se adquirieron de Corning (St. Lowell, MA). El reactivo de quimioluminiscencia y azul de *Coomassie*, fueron adquiridos en Bio-Rad (Hercules, CA) y las placas radiográficas de KODAK (Rochester, NY).

Cultivo celular

Los cultivos de la línea celular MCF10A se realizaron utilizando el medio DMEM/F12 (1:1) suplementado con 5% de SFB, 10 µg/mL de insulina, 0.5 µg/mL de hidrocortisona, 20 ng/mL de EGF y 1% de antibióticos. Los cultivos se dejaron crecer en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37 °C. Posteriormente los cultivos confluentes se pusieron en supresión durante 4 h previas al tratamiento con leptina y/o PP2.

Protocolo de estimulación

Los cultivos celulares se colocaron en supresión de suero durante 4 h, posteriormente se trataron con 10 µM de PP2 durante 30 min. La estimulación se realizó con 400 ng/mL de leptina durante 24 h para zimografía y 48 h para los ensayos de formación de invadopodios e invasión celular. Se detuvo el tratamiento con la remoción del medio de cultivo, se separaron los sobrenadantes y las células se lisaron utilizando el buffer de lisis RIPA (50 M HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 100 M NaF, 10 mM pirofosfato de sodio, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1.5 M MgCl₂, 0.1% SDS y 1 mM PMSF) para la obtención de las proteínas totales.

Zimografía en gelatina

Los sobrenadantes se centrifugaron por 5 min a 2, 500 rpm a 4°C y posteriormente se concentraron durante 40 min en unidades concentradoras de 50 mL. Se cargaron 1 µg/mL de proteínas concentradas y se separaron mediante electroforesis a 72 V utilizando un gel de poliacrilamida co polimerizado con gelatina bovina al 0.2%. Los geles se lavaron tres veces durante 30 min con Tritón X-100 al 2.5%, posteriormente se incubaron durante 24 h con buffer de activación (50 mM Tris:HCl pH 7.4, 5 mM CaCl₂). Al finalizar, los geles se tiñeron con azul de *Coomassie* al 2.5% y se destiñeron con solución de ácido acético (15%) y metanol (20%). La actividad de degradación se observó cómo bandas claras sobre un fondo azul.

Western blot

Se cargaron 30 µg de proteínas totales y se separaron por SDS-PAGE con geles al 10%, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se realizó un bloqueo a las membranas, durante 2 h utilizando una solución de leche descremada al 5% diluida en TBS-Tween-20 al 0.05%. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario acoplado a peroxidasa (anti GAPDH 1:500). Posterior a la incubación con el anticuerpo, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween-20 al 0.05%. Las bandas se visualizaron con reactivos de quimioluminiscencia y se revelaron en películas autoradiográficas.

Ensayos de formación de invadopodios

Se utilizaron cubreobjetos previamente tratados con ácido sulfúrico y etanol, se cubrieron con 50 µg/mL de poli-L-Lisina y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente se incubaron con glutaraldehído al 0.5% por 15 min a temperatura ambiente. Se cubrió la superficie de los cubreobjetos con una solución de gelatina bovina marcada con Alexa Fluor 488 al 0.2% y se incubaron a 37 °C por 30 min. Posteriormente se colocaron 1x10⁵ células previamente estimuladas con leptina, durante 6 h en medio suplementado con suero. Las células se fijaron con formaldehído al 4% y Tritón X-100 al 0.5 % durante 5 min a temperatura ambiente, se bloquearon con BSA al 3% toda la noche a 4 °C y al finalizar se incubaron con

faloidina conjugada con tetrametil rodamina (1:500) durante 30 min a 37 °C. El montaje de los cubreobjetos se realizó usando fluoroshield con DAPI y al finalizar se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX43).

Ensayos de invasión

Se colocaron 50 µL de matrigel a cada inserto de la cámara *Transwell*, y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, en la parte inferior de la cámara se colocaron 600 µL de medio basal suplementado y en la parte superior se sembraron 1×10^5 células previamente estimuladas, se incubaron durante 48 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Pasado el tiempo de incubación, se eliminaron de la parte superior las células que no invadieron, utilizando un hisopo del algodón. Las células remanentes en la parte inferior se fijaron con metanol frío por 5 min. Al finalizar se tiñeron con cristal violeta por 1 h y se obtuvieron las fotografías en un microscopio invertido (Labomed, TCM 400). La cantidad de células que invadieron, se estimó con el *software Image J*, analizando la densidad de cada cúmulo de células.

Análisis estadístico

Las imágenes obtenidas en los ensayos de zimografía en gelatina y *Western blot*, se analizaron por densitometría en el *software Image J v1.8.0_112*. Los resultados se expresaron como media \pm S.D. Los gráficos se realizaron con el programa estadístico *GraphPad Prism v5.0*. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de comparación múltiple de *Newman Keuls*, considerando un valor estadísticamente significativo a $p < 0.05$.

V.- RESULTADOS

Para determinar el papel de Src en la secreción de la MMP-2 y la MMP-9 en células MCF10A estimuladas con leptina, se realizó zimografía en gelatina. Las células se trataron con leptina y/o con el inhibidor químico de Src (PP2), se analizaron 4 condiciones experimentales. Como se observa en la figura 1 y 2, las células tratadas con leptina presentaron un aumento estadísticamente significativo en la secreción de la MMP-2 y MMP-9. En contraste, cuando las células fueron tratadas con PP2 se muestra una disminución en la secreción de las metaloproteasas.

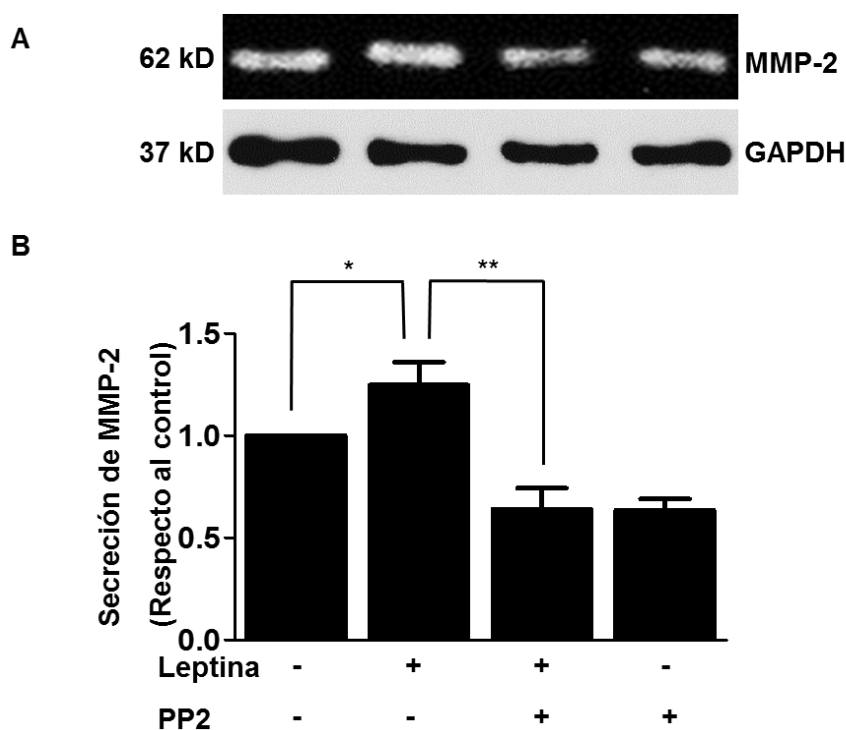


Figura 1. Src promueve la secreción de la MMP-2 en células MCF10A tratadas con leptina. Los cultivos celulares se pre trataron con 10 μ M de PP2 por 30 min y/o 400 ng/mL de leptina durante 24 h. Los ensayos se realizaron utilizando gelatina bovina al 0.2% como sustrato para la MMP-2. A) Imagen representativa de un experimento realizado por triplicado. En el panel superior se muestra la banda correspondiente a la MMP-2, en el panel inferior el blot correspondiente al control de carga. B) Representación gráfica del análisis densitométrico y estadístico. Análisis de varianza con la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

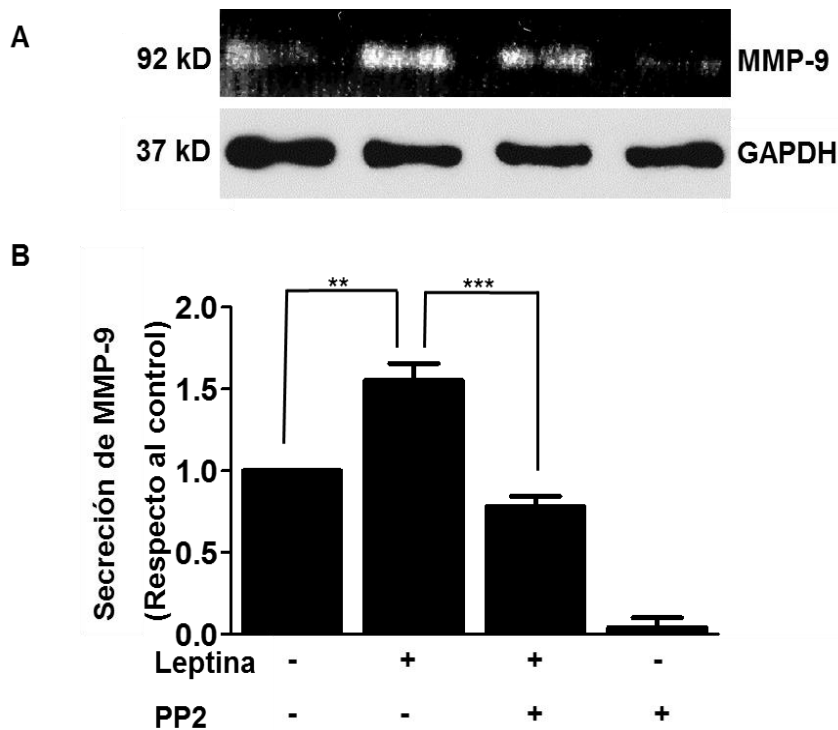


Figura 2. Src promueve la secreción de la MMP-9 en células MCF10A tratadas con leptina. Los cultivos celulares se pre trataron con 10 μ M de PP2 por 30 min y/o 400 ng/mL de leptina durante 24 h. Los ensayos se realizaron utilizando gelatina bovina al 0.2% como sustrato para la MMP-9. A) Imagen representativa de un experimento realizado por triplicado. En el panel superior se muestra la banda correspondiente a la MMP-9, en el panel inferior el blot correspondiente al control de carga. B) Representación gráfica del análisis densitométrico y estadístico. Análisis de varianza con la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Para determinar la participación de Src en la formación de invadopodios en células MCF10A estimuladas con leptina, se realizaron ensayos de formación de invadopodios en gelatina marcada con Alexa Fluor 488. Los resultados en la figura 3, muestran la formación de puntos de actina y un aumento en la degradación de la gelatina en células tratadas con leptina. Además, las zonas de degradación, se ven colocalizadas con los puntos de actina, esto es indicativo de la formación de invadopodios. De manera interesante, se observa, la ausencia de degradación de la gelatina en las células tratadas con PP2.

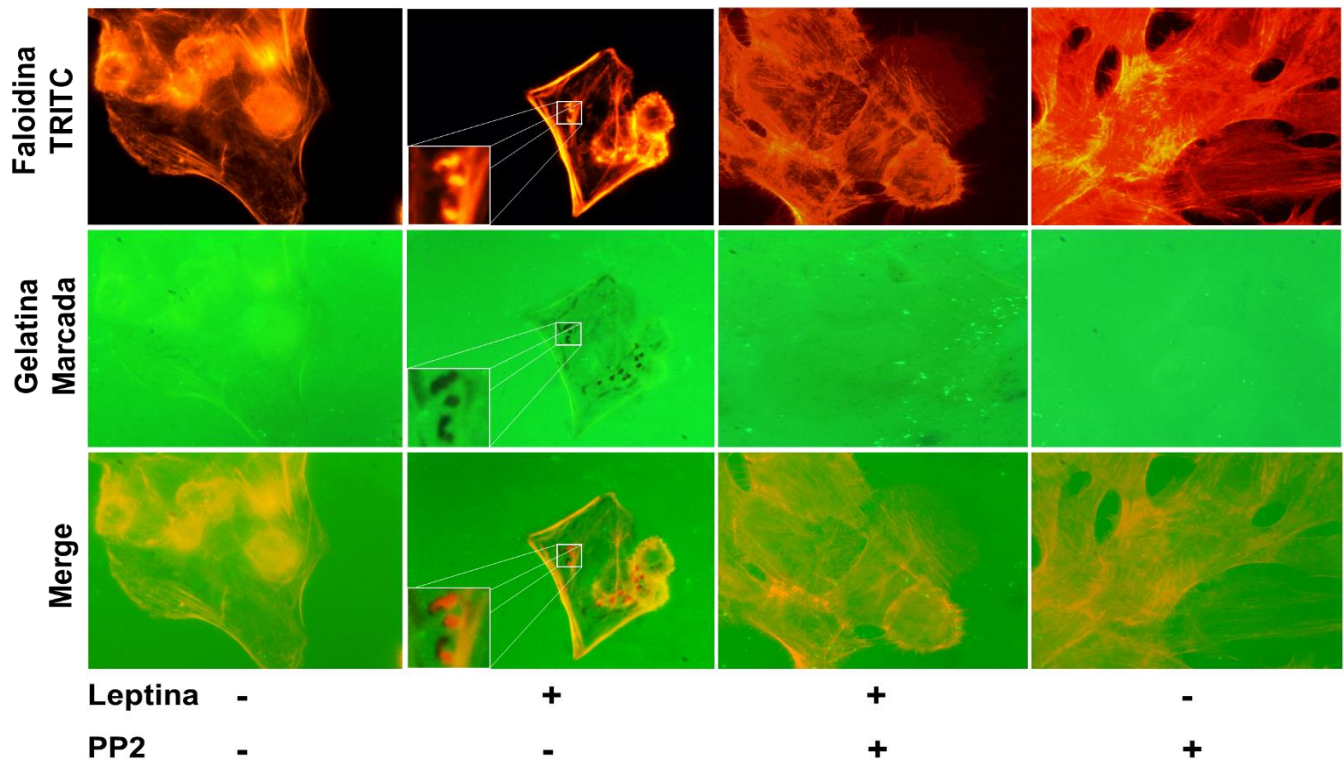


Figura 3. Src promueve la formación de invadopodios en células MCF10A tratadas con leptina. Los cultivos celulares se pre trataron con 10 μ M de PP2 por 30 min y/o 400 ng/mL de leptina durante 24 h. Los ensayos se realizaron utilizando gelatina bovina al 0.2% marcada con Alexa Fluor 488. Para teñir el citoesqueleto de actina, se empleó faloidina TRITC a dilución 1:500. Los cubreobjetos se montaron utilizando fluoroshield con DAPI. A) Imágenes representativas de un experimento realizado por triplicado. Las imágenes se tomaron usando microscopía de fluorescencia (100X) y fueron editadas con el software *Image J*.

Para evaluar la participación de Src en la invasión celular en células MCF10A estimuladas con leptina, se realizaron ensayos de invasión en cámaras *Transwell*. Las células se trataron con leptina y/o con PP2. Se observa que leptina potencia la invasión celular. Sin embargo, esto disminuye cuando las células se trataron con PP2 (Figura 4).

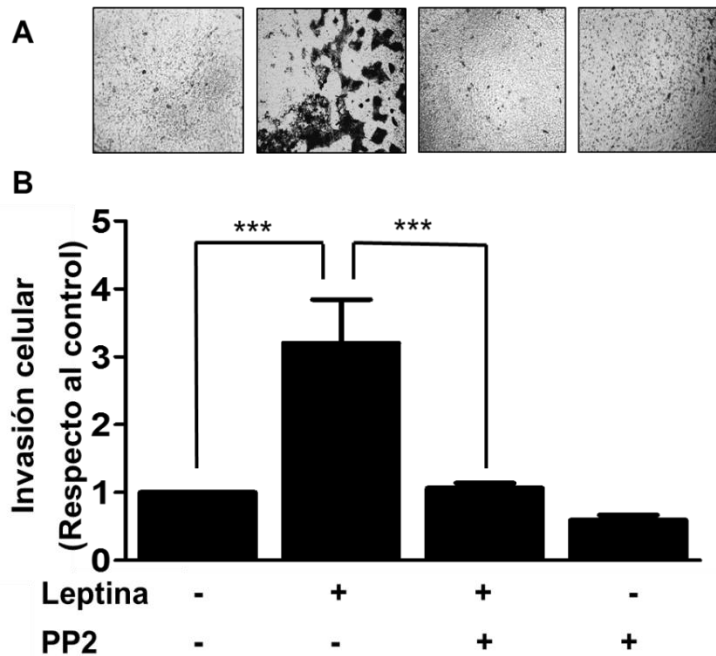


Figura 4. Src promueve la invasión celular en células MCF10A tratadas con leptina. Los cultivos celulares se pre trataron con 10 μ M de PP2 por 30 min y/o 400 ng/mL de leptina durante 24 h. Los ensayos se realizaron utilizando cámaras *Transwell* recubiertas con 50 μ l de matrigel. Las células fueron resuspendidas en medio basal con suero fetal bovino al 5%. A) Imágenes representativas de un experimento realizado por triplicado. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido (10X) y analizadas con el *software Image J*. B) Representación gráfica del análisis densitométrico y estadístico. Análisis de varianza con la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (***) $p < 0.001$.

VI.- DISCUSIÓN

La obesidad es un problema importante de salud pública, ya que se asocia con una variedad de trastornos metabólicos y está bien establecido que es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama (Barone *et al.*, 2016; Garofalo & Surmacz, 2006). En esta condición una gran cantidad de estrógenos y adipocinas son secretadas por el tejido adiposo las cuales modifican el microambiente celular y activan vías de señalización que favorecen el desarrollo y progresión del cáncer de mama (Cleary & Grossmann, 2009). Datos epidemiológicos reportan altos niveles de leptina en pacientes obesas con cáncer de mama, comparadas con pacientes clínicamente sanas u obesas sin cáncer (Sinicrope, 2010; Hovey & Aimo, 2010). En tejido de pacientes con cáncer de mama, se ha reportado la sobre expresión de leptina y su receptor, comparado con tejido de pacientes clínicamente sanas (Ishikawa *et al.*, 2004). La ETM representa un papel muy importante durante la progresión del cáncer de mama (Yan *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2016; Misra *et al.*, 2017). Estudios recientes, reportan que leptina induce la EMT en células de epitelio mamario, promoviendo la invasión y migración celular de tipo colectiva a través de la activación de la cinasa FAK (Wei *et al.*, 2016; Villanueva-Duque *et al.*, 2017).

Una de las consecuencias funcionales de la EMT es la invasión celular donde es indispensable la participación de MMPs que degradan los componentes de la ECM (Hanahan & Weinberg, 2000). La MMP-2 y MMP-9 se han asociado con la capacidad de metástasis de las células tumorales debido a su capacidad para degradar colágeno IV y su elevada expresión en tumores malignos. En este trabajo, evaluamos la secreción de la MMP-2 y MMP-9 en células MCF10A tratadas con leptina, se observa que leptina induce un aumento en la secreción de la MMP-2 y MMP-9. En líneas celulares de cáncer de mama, se ha reportado la participación de ambas MMPs, en procesos de invasión, metástasis y angiogénesis (Duffy *et al.*, 2000). En investigaciones realizadas por Wang *et al* (2013), observaron que leptina promueve migración e invasión en células MCF7 y que durante este proceso hay un aumento en la expresión de MMP-9 y TGF- β . Por su parte, McMurtry *et al* (2008)

demonstraron la participación de leptina en la invasión celular y secreción de la MMP-2 en la misma línea celular.

Src es una tirosina cinasa que puede interactuar con una variedad de factores de crecimiento como el EGFR, PDGFR, GPCRs y moléculas señalizadoras como los miembros de la familia STAT y FAK regulando vías de señalización que resultan en procesos como proliferación celular, motilidad, migración e invasión (Hiscox & Nicholson, 2008). Se ha descrito que la secreción de las MMP-2 y MMP-9 en células MCF-7 estimuladas con colágeno tipo IV, es dependiente de Src (Cortes-Reynosa *et al.*, 2007). Por su parte, Baumgartner *et al.* (2008) demostraron que Src participa en la secreción de MMP-2 en células MCF10A. En nuestros resultados se observa que PP2 inhibe la secreción de las MMP-2 y MMP-9, este hallazgo sugiere que la secreción de las MMP-2 y MMP-9 es dependiente de la actividad cinasa de Src. En otros estudios en modelos celulares se ha descrito que la actividad en conjunto de las cinasas Src y FAK es necesaria para promover la secreción de MMPs (Kim *et al.*, 2009).

Durante el proceso invasivo, las células tumorales forman estructuras especializadas denominadas invadopodios, que tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular adyacente (Destaing *et al.*, 2011). Durante la formación de invadopodios es muy importante la participación de la cinasa Src, se ha descrito que puede reclutar proteínas como cofilina, N-WASP, Tks5 y cortactina que promueven y regulan la polimerización de actina favoreciendo la extensión y maduración de los invadopodios en el lado ventral de las células, una vez formadas estas estructuras, se promueve la degradación de la ECM como consecuencia de la acumulación y actividad localizada de las MMPs secretadas, particularmente la MMP-2 y MMP-9, y las MMPs unidas a la membrana como la MMP-14 (Murphy & Courtneidge, 2011). Recientemente se reportó que Src regula la formación de invadopodios en células MCF10A, durante la EMT activada por TGF- β (Pignatelli *et al.*, 2012), también se demostró que, en células de cáncer de mama, Src regula la maduración de los invadopodios durante el proceso de invasión (Mader *et al.*, 2011). Estudios de nuestro grupo de trabajo, muestran que leptina promueve la formación de

invadopodios y secreción de MMPs en la línea celular MCF10A, y que estos eventos podrían ser regulados por FAK (Tacuba-Saavedra, 2018). Por este motivo, en este trabajo evaluamos el papel de Src en la formación de invadopodios en células MCF10A y descubrimos que leptina promueve la formación de invadopodios de manera dependiente de Src (Figura 3).

Una de las mejores maneras para evaluar el potencial invasivo *in vitro* de las células es a través de ensayos de invasión, un proceso importante durante la metástasis de las células tumorales, que es causa del mal pronóstico en las pacientes (Clark, 2015). Por lo tanto, en este trabajo, evaluamos el efecto de leptina en la invasión celular de células MCF10A. Los resultados obtenidos muestran que leptina potencia la capacidad invasiva de las células (Figura 4). Dado que Src puede regular vías de señalización que resultan en invasión celular, decidimos evaluar su papel en la invasión celular inducida por leptina en las células MCF10A. En los resultados se muestra que las células disminuyen su capacidad invasiva después del tratamiento con PP2. Interesantemente, observamos grupos de células invasivas que mantenían los contactos célula-célula, sugiriendo una invasión de tipo colectiva. Este tipo de invasión se ha reportado en carcinomas invasivos de mama, próstata y páncreas (Friedl *et al.*, 2012), pero no se ha reportado en células MCF10A. Sin embargo, recientemente se describió que en esta línea celular, leptina induce EMT de tipo parcial, en el que las células mantienen parcialmente sus uniones y desarrollaron un proceso de migración de tipo colectiva (Villanueva-Duque *et al.*, 2017), por lo tanto consideramos la posibilidad que también promueve la invasión celular de tipo colectiva.

Estos resultados sugieren que los procesos implicados en la invasión celular activada por leptina durante la EMT de células epiteliales mamarias MCF10A, son dependientes de Src.

VII.- CONCLUSIÓN

En este trabajo demostramos que leptina induce la secreción de la MMP-2 y MMP-9, formación de invadopodios e invasión celular en células de epitelio mamario no tumoral MCF10A de manera dependiente de la cinasa Src. Se ha descrito que estos procesos están involucrados en la progresión tumoral del cáncer de mama.

VIII. – REFERENCIAS

- Barone, I., Giordano, C., Bonofiglio, D., Andó, S., & Catalano, S. (2016). Leptin, obesity and breast cancer: progress to understanding the molecular connections. *Current opinion in pharmacology*, 31, 83-89.
- Baumgartner, M., Radziwill, G., Lorger, 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), 642-655.
- Clark, A. G., & Vignjevic, D. M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current opinion in cell biology*, 36, 13-22.
- Cleary, M. P., & Grossmann, M. E. (2009). Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology*, 150(6), 2537-2542.
- Cortes-Reynosa, P., Robledo, T., Macias-Silva, M., Wu, S. V., & Salazar, E. P. (2008). Src kinase regulates metalloproteinase-9 secretion induced by type IV collagen in MCF-7 human breast cancer cells. *Matrix biology*, 27(3), 220-231.
- De Craene B, Berx G (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13(2):97–110.
- Destaing, O., Block, M. R., Planus, E., & Albiges-Rizo, C. (2011). Invadosome regulation by adhesion signaling. *Current opinion in cell biology*, 23(5), 597-606.
- Duffy, M.J., Maguire, T. M., Hill, A., McDermott E. & O'Higgins, N. (2000). Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast cancer research*, 2(4): 252–257.
- Elsberger, B., Tan, B. A., Mitchell, T. J., Brown, S. B., Mallon, E. A., Tovey, S. M., & Edwards, J. (2009). Is expression or activation of Src kinase associated with cancer-specific survival in ER-, PR-and HER2-negative breast cancer patients?. *The American journal of pathology*, 175(4), 1389-1397.
- Finn, R. S. (2008). Targeting Src in breast cancer. *Annals of oncology*, 19(8), 1379-1386.
- Foroni, C., Brogгинi, M., Generali, D., & Damia, G. (2012). Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer treatment reviews*, 38(6), 689-697.
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., & Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nature cell biology*, 14(8), 777.
- Garofalo, C., & Surmacz, E. (2006). Leptin and cancer. *Journal of cellular physiology*, 207(1), 12-22.

- Hiscox, S., & Nicholson, R. I. (2008). Src inhibitors in breast cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(6), 757-767.
- Hovey, R.C. & Aimo, L., (2010). Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15(3), pp.279–90.
- Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. (2004). Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin cancer research* 10(13): 4325–4331.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The journal of clinical investigation*. 119(6), 1420-1428.
- Kim, L. C., Song, L., & Haura, E. B. (2009). Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews clinical oncology*, 6(10), 587.
- La Rocca, G., Pucci-Minafra, I., Marrazzo, A., Taormina, P., & Minafra, S. (2004). Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *British journal of cancer*, 90(7), 1414.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15 (3), 178.
- Mader, C. C., Oser, M., Magalhaes, M. A., Bravo-Cordero, J. J., Condeelis, J., Koleske, A. J., & Gil-Henn, H. (2011). An EGFR–Src–Arg–cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer research*, 71(5), 1730-1741.
- McMurtry, V., Simeone, A. M., Nieves-Alicea, R., & Tari, A. M. (2008). Leptin utilizes Jun N-terminal kinases to stimulate the invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Clinical & experimental metastasis*, 26(3), 197-204.
- Min, C., Eddy, S. F., Sherr, D. H., & Sonenshein, G. E. (2008). NF- κ B and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 104(3), 733-744.
- 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.
- Murphy, D.A. & Courtneidge, S.A., (2011). The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 413.
- Niu, J., Jiang, L., Guo, W., Shao, L., Liu, Y., & Wang, L. (2013). The association between leptin level and breast cancer: a meta-analysis. *PloS one*, 8(6), e67349.
- Pignatelli, J., Tumbarello, D. A., Schmidt, R. P., & Turner, C. E. (2012). Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF- β –induced epithelial–mesenchymal transition. *J cell Biology*, 197(3), 421-437.

- Rendón-Nava L., Petronilo-Navarrete R. (2015). Papel de Src sobre la secreción de metaloproteinasas e invasión en células de cáncer de mama estimuladas con leptina. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Sato, R., Semba, T., Saya, H., & Arima, Y. (2016). Concise review: Stem cells and Epithelial-Mesenchymal Transition in cancer: Biological implications and therapeutic targets. *Stem Cells*, 34(8), 1997-2007.
- Schmidt, S., Monk, J. M., Robinson, L. E., & Mourtzakis, M. (2015). The integrative role of leptin, oestrogen and the insulin family in obesity-associated breast cancer: potential effects of exercise. *Obesity reviews*, 16(6), 473-487.
- Shah, F. D., Shukla, S. N., Shah, P. M., Shukla, H. K., & Patel, P. S. (2009). Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. *Indian journal of cancer*, 46(3), 194.
- Sinicrope, F. A., & Dannenberg, A. J. (2010). Obesity and breast cancer prognosis: weight of the evidence. *Journal of clinical oncology*, 29(1), 4-7.
- Summy, J. M., & Gallick, G. E. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer and metastasis reviews*, 22(4), 337-358.
- Tacuva-Saavedra A. (2018). Evaluación del papel de FAK en la actividad de metaloproteasas de matriz durante la transición epitelio-mesenchimal inducida por leptina en células MCF10A. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Villanueva-Duque A. Zuniga Eulogio MD. Dena-Beltran J. Castaneda-Saucedo E. Calixto-Galvez M. Mendoza-Catalán MA. Ortuno-Pineda C. Navarro-Tito N. (2017). Leptin induces partial epithelial-mesenchymal transition in a FAK-ERK dependent pathway in MCF10A mammary non-tumorigenic cells. *Int J Clin Exp Pathol*; 10(10):10334-10342.
- Wang, L., Cao, H., Pang, X., Li, K., Dang, W., Tang, H., & Chen, T. (2013). The effect of leptin and its mechanisms on the migration and invasion of human breast cancer MCF-7 cells. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi= Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 29(12), 1272-1276.
- Weaver, A. M. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical & experimental metastasis*, 23(2), 97-105.
- Wei L., Li., 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.
- 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.

- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and metastasis reviews*, 28(1-2), 15-33.
- Yousef, E.M. *et al.*, (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC cancer*, 14(1), p.609.
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The journal of clinical investigation*, 119(6), 1429-1437.
- Zhang, S., & Yu, D. (2012). Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends in pharmacological sciences*, 33(3), 122-128.
- Zhou, Y., & Rui, L. (2013). Leptin signaling and leptin resistance. *Frontiers of medicine*, 7(2), 207-222.