

Leptina induce la migración celular por una vía dependiente de la Cinasa FAK en la línea celular de cáncer mama MCF7

JUÁREZ-CRUZ, Juan Carlos†, VISOSO-TORRES, Bernabé, CASTAÑEDA-SAUCEDO, Eduardo y NAVARRO-TITO, Napoleón*

Laboratorio de Biología Celular del Cáncer. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. UAGro. Av. Lázaro Cárdenas S/N C.P. 39087 Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro.

Recibido Junio 4, 2014; Aceptado Octubre 13, 2014

Resumen

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia invasiva más común y la principal causa de muerte en mujeres a nivel mundial (Scully et al., 2012). Se han descrito diversos factores de riesgo asociados con el inicio y desarrollo del CaMa, siendo uno de los más importantes la obesidad, ya que pacientes obesas presentan tumores más grandes, avanzados y agresivos en comparación con pacientes delgadas. La leptina es una hormona secretada principalmente por los adipocitos y cuyos niveles de expresión están incrementados en suero de personas con obesidad. Diversos estudios clínicos y experimentales, indican un papel importante de la leptina en el desarrollo de CaMa, una de las evidencias más relevantes es que los niveles séricos de la leptina se mantienen aumentados en pacientes con obesidad y CaMa (Guo et al., 2012). Por otro lado, la leptina y su receptor se sobreexpresan en tejido tumoral mamario primario y metastásico, en comparación con el epitelio mamario normal.

Leptina, cinasa, migración celular.

Abstract

Breast cancer (BC) is the most common invasive cancer and the leading cause of death in women worldwide (Scully et al., 2012). Described various risk factors associated with the onset and development of the bed, one of the most important obesity, since obese patients have larger, advanced and aggressive tumors compared to thin patients. Leptin is a hormone secreted by adipocytes and mainly whose expression levels are increased in sera of individuals with obesity. Several clinical and experimental studies indicate an important role of leptin in the development of bed, one of the most important evidence is that serum leptin levels remain elevated in patients with obesity and bed (Guo et al., 2012) . In addition, leptin and its receptor are overexpressed in primary and metastatic breast tumor tissue compared to normal breast epithelium.

Leptin, kinase, cell migration.

Citación: JUÁREZ-CRUZ, Juan Carlos, VISOSO-TORRES, Bernabé, CASTAÑEDA-SAUCEDO, Eduardo y NAVARRO-TITO, Napoleón. Leptina induce la migración celular por una vía dependiente de la Cinasa FAK en la línea celular de cáncer mama MCF7. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 Abril 2014, 1-1: 619-623

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: navarro@uagro.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Experimentalmente se ha demostrado que la leptina puede promover la progresión del CaMa, modulando el crecimiento celular, la inhibición de la apoptosis y la angiogénesis a través de la activación de vías mitogénicas, antiapoptóticas y metastásicas (Guo et al., 2012). La metástasis es un proceso que culmina en la formación de tumores secundarios en órganos distantes, siendo una de las principales complicaciones del CaMa; en este contexto, la migración celular es uno de los mecanismos celulares que marca el inicio y progresión de la metástasis, e implica la motilidad de las células cancerosas a través de la matriz extracelular (Scully et al., 2012). El proceso de migración celular implica la formación de estructuras específicas llamadas adhesiones focales, las cuales son estructuras multimoleculares de contacto entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, formadas en el frente de migración de las células migratorias (Frame et al., 2010). La formación de las adhesiones focales es regulada por la familia de las integrinas, que son receptores celulares que interactúan con la matriz extracelular. Una proteína de señalización acoplada a las integrinas en las adhesiones focales, es la cinasa de adhesión focal (FAK) (Frame et al., 2010). De manera normal la cinasa FAK se activa por autofosforilación en la tirosina 397 en respuesta a la agrupación de integrinas, una vez activa, modula vías de señalización relacionadas con la proliferación, supervivencia, migración celular y promoción de la angiogénesis. Diversos estudios clínicos y experimentales, indican un papel importante de la FAK en el desarrollo de CaMa. Una de las evidencias más importantes es que FAK se ha encontrado hiperactivada conforme el CaMa avanza a estadios tumorales primarios, invasivos y metastásicos. Por otra parte, en líneas celulares de CaMa se ha demostrado que diferentes factores de crecimiento o lípidos a través de sus receptores, modula la activación de FAK y promueven la migración celular e inhibición de la apoptosis (Long et al., 2010).

En este contexto, no se ha determinado en el papel de la leptina sobre la activación de FAK y la migración celular.

Objetivos

Establecer si la leptina induce migración celular en la línea de CaMa MCF7.

Determinar los niveles de activación de la cinasa FAK en la línea MCF7 de CaMa tras la estimulación con leptina.

Determinar el papel de FAK en la migración celular inducida por leptina en la línea de CaMa MCF7.

Metodología

Las células MCF7 fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 5% de suero fetal bovino y antibióticos en cajas de 60 mm, los cultivos fueron crecidos a una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C.

Para determinar la migración celular inducida por leptina, se realizaron ensayos de migración por el método de cierre de herida, los cultivos celulares confluentes se sometieron a supresión de suero durante 24 horas, se pretrataron los cultivos con el inhibidor de proliferación celular, Ara C durante 2 horas. Posteriormente se realizó una herida al cultivo celular con una punta de pipeta estéril, y se añadieron diferentes dosis de leptina. Después de 48 horas de incubación, las células se fijaron con formaldehído al 3.7%, y se tomaron fotografías de las diferentes condiciones usando el objetivo 10X de un microscopio de campo claro. El cálculo de cierre de herida se realizó empleando el programa Image J.

Para observar los niveles de activación de FAK, los cultivos celulares confluentes se sometieron a supresión de suero durante 24 horas, se estimularon con leptina a diferentes tiempos. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales, las cuales se separaron por SDS-PAGE al 10%, seguido de su transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Posterior a la transferencia, las membranas fueron bloqueadas usando 5% de leche descremada en PBS/1% Tween 20 (Buffer de lavado, pH 7.4) e incubadas con anticuerpo primario durante 12 horas a 4 °C. Las membranas fueron lavadas tres veces con buffer de lavado e incubadas con anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con buffer de lavado para visualizar las bandas usando un equipo de quimioluminiscencia y placas autorradiográficas. La intensidad relativa de las bandas se determinó por medio de análisis densitométrico empleando el programa Image J.

Para evaluar el papel de las cinasas en la migración celular, se realizaron ensayos de cierre de herida con la dosis de leptina donde se observó mayor migración celular inducida por leptina, más el inhibidor específico de FAK (PF-573228), a una concentración de 5 μ M.

Los resultados fueron expresados con una media \pm S.D., realizando el análisis estadístico mediante ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Dunnett o de Newman-Keuls utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5.0. La probabilidad estadística $p < 0.05$ fue considerada significativa.

Resultados

Para evaluar el efecto de la leptina en la migración celular se realizaron ensayos de migración por el método de cierre de herida con diferentes dosis de leptina. Los resultados obtenidos en la línea MCF7.

Muestran que la leptina induce un aumento en la migración celular en comparación con las células no estimuladas con leptina, a partir de la dosis de 50 ng/mL, teniendo el mayor cierre de herida a la dosis de 200 y 400 ng/mL (Figura 1).

Para determinar el efecto de la leptina en la activación de la cinasa FAK en la línea MCF7 se realizaron ensayos a diferentes tiempos con una dosis de leptina de 400 ng/mL. Los resultados obtenidos en la línea MCF7 muestran que la leptina induce la activación de FAK, encontrando un pico máximo de fosforilación a los 30 minutos (Figura 2).

Considerando que la leptina induce la activación de FAK y la migración celular en esta línea celular se decidió evaluar el papel de FAK en la migración celular inducida por leptina, para lo cual se utilizó el inhibidor químico específico para FAK en ensayos de migración por cierre de herida. Los resultados obtenidos indican que la migración inducida por leptina es disminuida alrededor de un 25-30 por ciento cuando se usa el inhibidor específico para FAK, PF-573228 (Figura 3).

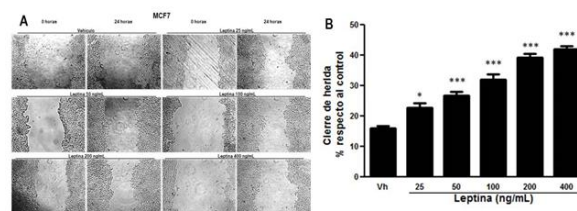


Figura 1 Efecto de la leptina sobre la migración celular en la línea MCF7. Panel A. Ensayos de migración por cierre de herida de la línea MCF7, las cuales fueron estimuladas con dosis de leptina de 25, 50, 100, 200 y 400 ng/mL y el vehículo de leptina (control, células no tratadas). Las células fueron incubadas durante 48 horas. Panel B. La gráfica corresponde al porcentaje de cierre de herida para cada condición, representando las medias y SD.

La significancia estadística fue calculada mediante ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Dunnett's. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control de las células no tratadas con leptina.

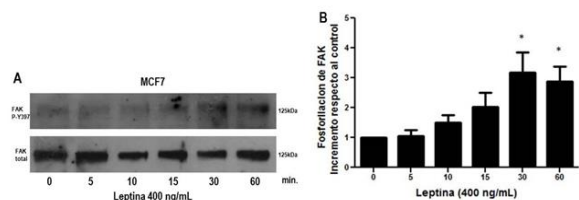


Figura 2 Curso temporal de la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) en la línea celular MCF7. Panel A. Las células MCF7 fueron tratadas con 50 ng/mL de leptina durante 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferencia a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos para FAK Tyr(P)-397 y FAK total. Panel B. Gráfica que muestra la densitometría de la banda. La imagen es representativa de dos diferentes experimentos independientes con resultados similares. La significancia estadística fue calculada mediante ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Dunnett's. ** $P < 0.01$ vs control de las células no tratadas con leptina.

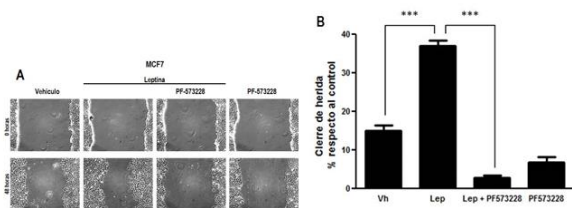


Figura 3 Papel de FAK en la migración celular inducida por leptina en la línea MCF7. Panel A. Migración celular por cierre de herida de la línea MCF7, estimulada con vehículo de leptina (control, células no tratadas), leptina (400 ng/ml), leptina (400 ng/ml) + PF-573228 (5 μ M) y PF-573228 (5 μ M) solo. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. Panel B. La gráfica del porcentaje de cierre de herida para cada condición, representando las medias y SD.

La significancia estadística fue calculada mediante ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls. *** $P < 0.001$ vs control de las células tratadas con leptina.

Discusión

El presente estudio demostró y confirmó que la leptina induce migración celular y que tal migración es de manera dependiente de la dosis en la línea MCF7 de morfología epitelial-luminal y un comportamiento metastásico poco invasivo, este comportamiento sugiere que, las dosis elevadas podrían estar involucradas en un progreso metastásico en CaMa (Guo et al., 2012; Scully et al., 2012).

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo determinan por primera vez en línea celular MCF7, que la leptina induce la fosforilación y por lo tanto la activación de la cinasa FAK, en comparación con las células control, y que tal activación es específica del tiempo. Aun cuando FAK interacciona con diversas proteínas incluyendo Src, PI-3K e integrinas, se desconoce si la interacción de FAK con proteínas como el receptor de leptina, JAK2 y STAT3 clásicas de las vías activadas por leptina, permiten la activación de FAK, en este sentido los mecanismos involucrados en la activación de FAK a través del receptor de leptina no han sido descritos, por lo que posteriores estudios evidenciarán las proteínas relacionadas con la activación de FAK tras la estimulación con leptina (Raïke et al., 2010; Guo et al., 2012).

El comportamiento de las células MCF7 estimuladas con leptina más el inhibidor de FAK, evidencia el papel de esta cinasa en la migración celular inducida por leptina, principalmente para la formación de adhesiones focales y mantenimiento de estas estructuras durante la migración (Raïke et al., 2010).

Conclusión

Se determinó que el estímulo de leptina sobre la línea MCF7 de CaMa favorece la migración celular de manera dependiente de la dosis. Por otro lado, se determinó que el tratamiento con leptina modula los niveles de activación de la cinasa FAK en la línea MCF7 de CaMa, siendo este evento dependiente del tiempo. Por último se determinó que la migración celular inducida por leptina es dependiente de una vía de señalización mediada por la actividad cinasa de FAK en la línea celular MCF7 de CaMa.

Referencias

Frame M., Patel H., Serrels B., Lietha D. and Eck M. (2010). The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11(11):802-814.

Guo S., Liu M., Wang G. and Gonzalez R. (2012). Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1825(2):207–222.

Long W., Yi P., Amazit L., LaMarca H., Ashcroft F., Kumar R., et al. (2010). SRC-3Delta4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration. *Molecular Cell*. 37(3):321-332.

Ratke J., Entschladen F., Niggemann B., Zänker K. & Lang K. (2010). Leptin stimulates the migration of colon carcinoma cells by multiple signaling pathways. *Endocrine-Related Cancer*. 17(1):179-189.

Scully O., Bay B., Yip G. and Yu Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research*. 9(5): 311-320.