

La leptina induce transición epitelio-mesénquima mediante la activación de ERK en células MCF10A en respuesta a leptina

VILLANUEVA-DUQUE, José Alfredo*†, CASTAÑEDA-SAUCEDO, Eduardo, CALIXTO-GÁLVEZ, Mercedes, NAVARRO-TITO, Napoleón

Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas S/N Ciudad Universitaria, Chilpancingo Gro.

Recibido Junio 4, 2014; Aceptado Octubre 13, 2014

Resumen

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en México, para el desarrollo de esta neoplasia se han descrito diversos factores de riesgo; entre los que destacan los relacionados con la exposición a estrógenos por tiempos prolongados, la nuliparidad, el inicio de menarca antes de los 12 años, menopausia posterior a los 45 años y el uso de terapia hormonal de remplazo por más de 5 años. Por otro lado, las mutaciones genéticas en los genes BRCA1 y BRCA2 dan un riesgo de por vida para el desarrollo de cáncer de mama y los estilos de vida como el tabaquismo, alcoholismo y sedentarismo favorecen el desarrollo de esta neoplasia, recientemente se ha identificado en estudios epidemiológicos a la obesidad como un factor de riesgo importante para el desarrollo de esta enfermedad, debido al incremento en la producción de proteínas por parte de los adipocitos que pueden activar vías de señalización que contribuyen a la transformación celular, entre las que destaca la leptina (Garofalo et al, 2006).

Leptina, epitelio-mesénquima, ERK.

Abstract

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women in Mexico, for the development of this tumor have been described various risk factors; most notably those related to estrogen exposure for prolonged periods, nulliparity, the onset of menarche before age 12, 45 years after menopause and use of hormone replacement therapy for more than five years. On the other hand, genetic mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes are given a lifetime risk for developing breast cancer and lifestyles such as smoking, alcohol and physical inactivity contribute to the development of this neoplasm, has recently been identified in Epidemiological obesity as a significant risk factor for developing this disease risk, due to increased protein production by adipocytes that can activate signaling pathways that contribute to cellular transformation, among which studies leptin (Garofalo et al, 2006).

Leptin, epithelial-mesenchymal, ERK.

Citación: VILLANUEVA-DUQUE, José Alfredo, CASTAÑEDA-SAUCEDO, Eduardo, CALIXTO-GÁLVEZ, Mercedes, NAVARRO-TITO, Napoleón. La leptina induce transición epitelio-mesénquima mediante la activación de ERK en células MCF10A en respuesta a leptina. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2014 Abril 2015, 1-2:653-658

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: alfredo.vnueva@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Un evento importante en la carcinogénesis mamaria es la transformación celular mediante un proceso llamado transición epitelio-mesénquima (TEM), el cual se caracteriza por la transdiferenciación de las células epiteliales a un fenotipo mesenquimal. Existen diferentes estímulos para el desarrollo de la TEM, uno de estos son los factores de crecimiento entre los que destaca TGF β , los ácidos grasos, interleucinas entre otros, los cuales activan vías de señalización como las de MAPK y PI3K/Akt que participan activamente en la proliferación, migración e invasión celular. La TEM está implicada en la progresión hacia el fenotipo maligno de las neoplasias; este proceso incluye una serie de múltiples pasos caracterizados por la pérdida de uniones célula-célula y reorganización del citoesqueleto, lo cual resulta en la pérdida de la polaridad ápico-basal, algunos de los marcadores clásico de la TEM son la disminución de los niveles de E-cadherina y un aumento en los niveles de vimentina. E-cadherina es una glicoproteína transmembranal de cinco dominios repetidos citoplasmáticos y es expresada en células epiteliales, en su región extracelular tiene una función adherente y es dependiente de Ca²⁺, posee un dominio intracelular que interactúa con cateninas; cuyas funciones son la regulación de la citoarquitectura epitelial, conservan la morfogénesis celular y tisular, regulan los principales procesos celulares incluyendo motilidad, crecimiento, diferenciación y sobrevivencia. Existen diversos mecanismos por los cuales disminuyen los niveles de E-cadherina como son mutaciones puntuales, metilación del promotor del gen CDH1 (gen de E-cadherina) y represión transcripcional por Twist, Snail y Sip1, entre otros.

Otra proteína importante en la TEM es Vimentina la cual pertenece a los filamentos intermedios del citoesqueleto, y se ha relacionado con cambios morfológicos de fenotipo mesenquimal y aumento en la migración celular por lo que su sobreexpresión se considera como marcador del fenotipo mesenquimal de células tumorales.

La expresión incrementada de vimentina está relacionada con cambios en la morfología de las células haciéndolas elongadas, aumento en la formación de lamelipodios, fibras de estrés y adhesiones focales que facilitan la migración de las células (Berx and van Roy, 2009). La leptina es una proteína secretada por los adipocitos, la cual tiene como función central la regulación de la ingesta de alimentos y sus efectos son mediados a través de la unión con la isoforma Ob-Rb de su receptor, esta interacción activa vías de señalización clásicas como las de JAK/STAT3, MAPK y PI3K. Se ha determinado que en la obesidad existe una sobreproducción de esta proteína desarrollando un estado de hiperleptinemia y resistencia a la leptina debido principalmente por defectos en el transporte de leptina, unión de leptina con su receptor Ob-Rb o por disfunción hipotalámica en la activación de vías anorexigénicas; la leptina puede estimular la proliferación de múltiples tipos celulares tumorales y no tumorales; a si también se ha estimado que la cantidad de tejido adiposo es equivalente a la cantidad de leptina en circulación por lo que la obesidad es un factor importante en el desarrollo de esta neoplasia.

La vía de MAPK puede ser activada por leptina mediante la fosforilación de JAK2, donde el evento final de la vía es la activación de ERK 1/2, el cual se trasloca al núcleo donde tienen como blancos directos la expresión de genes como c-fos, c-jun y egr-2 los cuales participan en el inicio del crecimiento y diferenciación celular.

Por otro lado la vía de MAPK incrementa los niveles de Snail, el cual es un factor de transcripción que al unirse al promotor del gen CDH1 provoca su silenciamiento y consecuente disminución de los niveles de su proteína E-cadherina que de manera importante participa como supresora de tumor, debido a que al disminuir los niveles de E-cadherina provoca en las células epiteliales una serie de cambios como incremento en la migración.

Supervivencia, invasión y metástasis (Perera et al, 2008, Peinado et al, 2004).

Uno de los modelos estudiados para evaluar la TEM son las células de epitelio de mama no tumoral MCF10A debido a que al ser células no tumorales pueden semejar el proceso de transformación celular que puede ocurrir in vivo; se ha evaluado la TEM en MCF10A con el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) encontrando que este factor promueve el incremento en la degradación de la matriz extracelular, así como de la invasión a través de la formación de invadopodios y secreción de MMP2 y MMP9 respectivamente. También se ha reportado el estudio de estos marcadores de la TEM por estímulo de ácido araquidónico, ácido linoléico y colágena tipo IV obteniendo una disminución de E-cadherina y un aumento en la expresión de N-cadherina y vimentina; así como la secreción de MMP 2/9. En 2012 Yan et al, evaluaron a la leptina como inductora de la TEM en células MCF7 y MDA-MB-231 encontraron que la leptina requiere de la activación de β -catenina vía Akt/GSK3 y MTA1/Wnt; evaluaron marcadores de la TEM y encontraron niveles elevados en la expresión de fibronectina, N-cadherina, vimentina, Snail 1/2 en respuesta a los tratamientos con leptina, así mismo encontraron una disminución en la expresión de E-cadherina y ocludina.

Actualmente no hay reportes dónde se evalúe a la leptina como inductora de la TEM mediante la activación de ERK en la línea celular de epitelio mamario no tumoral MCF10A, la cual al no tener capacidades tumorales es un buen modelo de estudio de la progresión de cáncer de mama, y que puede evidenciar lo que pudiera estar sucediendo in vivo en mujeres con niveles altos de leptina y con desarrollo de cáncer de mama.

Objetivos

General

Evaluar la participación de ERK en la transición epitelio-mesénquima inducida por leptina en células de epitelio mamario no tumoral MCF10A.

Específicos

- Analizar los cambios morfológicos en las células MCF10A tratadas con leptina
- Evaluar el efecto de leptina sobre la migración en células MCF10A
- Analizar la participación de ERK en la migración de células MCF10A
- Determinar los niveles proteicos de E-cadherina y vimentina en células MCF10A en respuesta a estímulos con leptina

Metodología

En este estudio se utilizó la línea celular de epitelio mamario no tumoral MCF10A, se realizó curso temporal de ERK1/2 a 400 ng/ml de leptina durante 0, 5, 10, 15, 30 y 60 min esto para evaluar la activación de ERK1/2 en respuesta a leptina. También se evaluó la migración celular a diferentes dosis de leptina (25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml) por 48 h.

Las células alcanzaron confluencia total y posteriormente se hizo ralladura sobre el cultivo usando una punta de pipeta estéril. El progreso de la migración mediante el ensayo de cierre de herida en la fue analizado a las 0, 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml de leptina por 48 h, en este ensayo se utilizó Ara C (0.2 µl/ml) como inhibidor de proliferación, cada condición experimental se realizó por triplicado.

La migración de las células fue fotografiada a las 0 y 48 h de tratamiento usando un microscopio invertido acoplado a una cámara fotográfica.

Los cultivos celulares de MCF10A fueron lisados con RIPA para obtener los extractos proteicos; las proteínas fueron separadas en geles de acrilamida al 10% seguida por una transferencia a membranas de nitrocelulosa, posterior a la transferencia las membranas serán bloqueadas usando 5% de leche libre de grasa en buffer de solución salina (PBS) pH 7.2/0.05% Tween 20, se incubaron toda la noche con anticuerpo primario (1:1000) a 4°C, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05% y se incubaron con anticuerpo secundario (1:5000) por 2 hr a 22°C en agitación. Después se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 0.05%, las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas con reactivos de visualización HRP Chemiluminescent (NOVEX). Las bandas fueron identificadas en placas radiográficas. Se emplearon anticuerpos monoclonales, para E-cadherina (67A4), Vimentina (clona V9), β-catenina (clona 12F7) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA.) y ERK 1/2 y fosfoespecíficos de ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) (Millipore).

Resultados

Para evaluar los cambios morfológicos se usaron tratamiento en leptina en los cultivos, a la dosis de 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml.

Se observó pérdida de la polaridad celular, adquiriendo un fenotipo mesenquimal similar a fibroblastos; siendo más evidentes estas características en la dosis de 400 ng/ml.

Para evaluar la migración de las MCF10A, se realizaron ensayos de cierre de herida en los que observó se el cierre casi total de la herida a la dosis de 400 ng/ml de leptina, esta migración fue en grupo y con una dirección definida.

Para determinar si la TEM es dependiente de la actividad de la cinasa se determinaron los niveles proteicos de ERK 1/2 fosforilados (Thr202/Tyr204) y totales mediante Western blot, utilizando 400 ng/ml de leptina a 5, 10, 15, 30 y 60 min de tratamiento, en donde se observó un incremento en los niveles de fosforilación de esta proteína a los 5, 10 y 15 min de tratamiento. Se analizaron los niveles proteicos de E-cadherina y vimentina, mediante Western blot, encontramos que la disminución de los niveles de E-cadherina tuvieron una distribución diferencial, pero se observó una disminución en las dosis de 25, 50 y 100 ng/ml de leptina, por otro lado los niveles de vimentina aumentaron de manera proporcional al aumento en las dosis de leptina.

Resultados

Para evaluar los cambios morfológicos se usaron tratamiento en leptina en los cultivos, a la dosis de 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml, se observó pérdida de la polaridad celular, adquiriendo un fenotipo mesenquimal similar a fibroblastos; siendo más evidentes estas características en la dosis de 400 ng/ml.

Para evaluar la migración de las MCF10A, se realizaron ensayos de cierre de herida en los que observó se el cierre casi total de la herida a la dosis de 400 ng/ml de leptina, esta migración fue en grupo y con una dirección definida.

Para determinar si la TEM es dependiente de la actividad de la cinasa se determinaron los niveles proteicos de ERK 1/2 fosforilados (Thr202/Tyr204) y totales mediante Western blot, utilizando 400 ng/ml de leptina a 5, 10, 15, 30 y 60 min de tratamiento, en donde se observó un incremento en los niveles de fosforilación de esta proteína a los 5, 10 y 15 min de tratamiento.

Se analizaron los niveles proteicos de E-cadherina y vimentina, mediante Western blot, encontramos que la disminución de los niveles de E-cadherina tuvieron una distribución diferencial, pero se observó una disminución en las dosis de 25, 50 y 100 ng/ml de leptina, por otro lado los niveles de vimentina aumentaron de manera proporcional al aumento en las dosis de leptina.

Discusión

Actualmente el cáncer de mama se considera un problema de salud pública en México con más de 5 600 defunciones en 2012 (Globocan, 2012), uno de los factores para el desarrollo de la carcinogénesis mamaria es la obesidad, la cual se considera un estado de inflamación crónica en la cual existe una sobreproducción de proteínas como la leptina, la cual induce el aumento en la proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama, sin embargo no se ha determinado si en las células MCF10A participa de la misma manera, y mediante la activación de que vías de señalización pueden ocurrir estos eventos; con los resultados obtenidos en este estudio se puede evidenciar la participación de la leptina como inductora de la TEM en una línea celular de mama no tumoral mediante la activación de la cinasa ERK.

Se identificaron cambios morfológicos de fenotipo mesenquimal y un aumento en la migración celular, lo cual se relacionó con la disminución de los niveles proteicos de E-cadherina y con el aumento en la expresión de vimentina, lo cual es evidencia de que las células MCF10A pueden realizar TEM en respuesta a leptina. Las dosis de 400 ng/ml a las 48 h de estímulo son las que de manera importante mostraron cambios en la morfología, aumento en la migración y en la expresión de marcadores de la TEM, demostrando que dosis más altas a las fisiológicas de leptina (25-100 ng/ml) contribuyen de manera importante en los cambios celulares.

Conclusión

La TEM es un proceso mediante el cual las células adquieren un fenotipo maligno que contribuye al desarrollo y metástasis de las células cancerosas, este evento está relacionado con la carcinogénesis mamaria, se ha descrito que la leptina induce migración e invasión celular en líneas de cáncer de mama, este es un modelo que contribuye al entendimiento de lo que pudiera estar ocurriendo in vivo en mujeres con niveles altos de leptina y con inicio de tumorigénesis mamaria.

Referencias

- Berx, G., van Roy F., (2009) Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a003129.
- Garofalo, C., Koda, M., Cascio, S., Sulkowska, M., Kanczuga-Koda, L., Golaszewska, J., Russo, A., Sulkowski, S., Surmacz, E., 2006. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity related stimuli. *Clin Cancer Res*, 12:1447-53.

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

Perera, C., Chin, H.G., Duru, N., Camarillo,
I.G. 2008. Leptin-regulated gene expression
in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic
insights into leptin-regulated mammary tumor
growth and progression. *Endocrinol*,199: 221-
33.

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