
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE MEDICINA

LA METFORMINA REVIERTE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA INDUCIDA POR EGF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

TESIS

Como requisito para obtener el Grado de Especialista en:

ONCOLOGÍA MÉDICA

Presenta:

DR. BRIZIO MORENO JAIME

TUTOR DE TESIS

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA-SÁNCHEZ

CO-TUTORES

**DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ
DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ**

México, D.F. 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Facultad de Medicina



APROBACIÓN DE LA TESIS

LA METFORMINA REVIERTE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA INDUCIDA POR EGF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA-SÁNCHEZ

Investigador en Ciencias Médicas

Tutor de Tesis

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ

Investigador en Ciencias Médicas

Tutor de Tesis

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

Profesor titular del Curso de Especialización en Oncología Médica

Tutor de Tesis

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES

Director de Enseñanza

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Abreviaturas

AMPK	Cinasa activada por AMP (del inglés AMP-Activated Protein Kinase).
ATCC	American Type Culture Collection
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Del inglés: Epidermal Growth Factor).
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico (Del inglés: Epidermal Growth Factor Receptor).
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés fibroblast growth factor).
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos (del inglés hepatocyte growth factor).
HER2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés, human epidermal growth factor receptor 2).
IGF	Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, del inglés insulin growth factor).
IL-6	Interleucina 6
LKB1	Cinasa hepática B1 (del inglés Liver Kinase B1).
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase).
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, platelet-derived growth factor).
RE	Receptores estrogénicos.
RP	Receptores progesterona.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β (del inglés transforming growth factor beta).
STAT3	Transductor de señales y activador de transcripción 3 (del inglés, Signal Transducer and Activator of Transcription 3).
TEM	Transición epitelio-mesénquima.
TME	Transición mesénquima-epitelio.
TORC	Complejo 1 del Blanco de Rapamicina (del inglés, Target of Rapamycin Complex 1).

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.	1
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.	8
4. JUSTIFICACIÓN.	8
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	8
6. HIPÓTESIS.	8
7. OBJETIVOS.	9
8. MATERIALES Y MÉTODOS.	9
9. RESULTADOS.	11
10. DISCUSIÓN.	14
11. CONCLUSIÓN.	17
12. REFERENCIAS.	17

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada agradezco a mis padres y a mis hermanos, a mi abuelita Elba y a mi tía Elisa que durante estos tres años siempre me mostraron su profundo apoyo y estuvieron al pendiente de mi estancia en esta ciudad mientras realizaba mis estudios de posgrado.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis Tutores de Tesis, la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez y el Dr. José Esparza López, que mientras me orientaba e instruía en la realización de este proyecto, fortalecieron mi interés por la investigación en ciencias básicas. Les agradezco su infinita paciencia y la enorme cantidad de destrezas y conocimientos aportados, invaluable en la formación de un residente de Oncología Médica.

A mi profesor titular el Dr. Eucario León Rodríguez que fomentó la obligación de los médicos a continuar aportando nueva información a la comunidad científica.

A la Dra. Andrea Castro Sánchez que compartió parte de su experiencia en esta labor y estuvo siempre dispuesta a brindarme sus consejos en el área.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la valiosa ayuda de todo el personal de la Unidad de Bioquímica “Dr. Guillermo Soberón Acevedo” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

RESUMEN

Antecedentes: La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso biológico en el que células epiteliales inmóviles y polarizadas se convierten en células mesenquimales con capacidad de migración. Este proceso produce cambios en el citoesqueleto de las células, siendo la pérdida de E-cadherina y la adquisición de N-cadherina, uno de los principales cambios bioquímicos que se dan en la TEM. En los últimos años, se han realizado varios estudios tratando de interferir con la TEM; dentro de estos estudios se ha propuesto a la Metformina como un fármaco que puede bloquear la TEM mediada por IL-6 y TGF- β en distintos tipos de cáncer. En este estudio investigamos el papel de la Metformina sobre la TEM inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama.

Métodos: Para este estudio se empleó la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y los cultivos primarios MBCD25 y MBCDF. Se indujo una TEM mediante el tratamiento continuo con EGF. El efecto de la Metformina sobre la TEM, se evaluó después de que las células habían sido previamente inducidas a un fenotipo mesenquimatoso con EGF, después las células fueron tratadas con Metformina y EGF por cuatro días más. Se realizó Western Blot para analizar la fosforilación de STAT3, el nivel de STAT3, y la expresión o represión de los marcadores de TEM E-cadherina, N-cadherina y el factor de transcripción Snail.

Resultados: Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con EGF induce la fosforilación de STAT3 sin cambios en sus niveles totales en células MBCDF, MBCD25 y MCF-7. Asimismo, el tratamiento con EGF por 5 días induce una TEM, que se demostró por la pérdida de E-cadherina y la expresión de Snail. El co-tratamiento con Metformina y EGF provocó una re-expresión de E-cadherina, así como una represión de N-cadherina y Snail.

Conclusión: En los cultivos primarios MBCD25 y MBCDF, así como en la línea celular MCF-7 el tratamiento con Metformina es capaz de revertir la TEM inducida por EGF, reprimiendo la expresión de N-cadherina y Snail, además de la re-expresión de E-cadherina. Estos resultados sugieren que la Metformina podría ser una alternativa para bloquear el potencial metastásico, la resistencia a fármacos de quimioterapia, y la recurrencia tumoral, los cuales están asociados a un pobre pronóstico en cáncer de mama.

INTRODUCCIÓN

En México, desde el 2006, el cáncer de mama ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres por neoplasias malignas, desplazando de esta posición al cáncer cérvico-uterino. Aproximadamente 60% de los casos se diagnóstica en etapas avanzadas. De acuerdo a estadísticas de Globocan, para el año 2030, 24,326 mujeres serán diagnosticadas con cáncer de mama en México y 9,778 morirán debido a esta enfermedad [1, 2]. Mediante ensayos genéticos el cáncer de mama ha sido clasificado en al menos cuatro subtipos moleculares: Luminal A, se caracteriza por la presencia de receptores estrogénicos (RE) y de progesterona (RP), ausencia de sobre-expresión de HER2 y un índice de proliferación Ki67 menor a 14%, se presenta en aproximadamente 40% de los casos, estas pacientes por lo general tienen un buen pronóstico con una Razón de Riesgo para muerte de 1.16 (IC 95%, 0.47-2.85). Luminal B con un 20% de los casos y un pronóstico intermedio, se caracteriza por RE+, RP+, HER2- y Ki67 <14% o cualquier Ki67 y HER2 sobre-expresado. Los catalogados como HER2 positivos con RE y RP negativos representan entre 10-15% de los casos y se considera de mal pronóstico. Basaloide con una frecuencia de 15-20%, RE-, RP-, HER2-, expresión alta de Ki67, EGFR+, Citoqueratina (CK) 5/6, 14 y 17 positivas, éste último con un pronóstico desfavorable con una Razón de Riesgo para muerte de 12.41 (IC 95%, 5.82-26.49) [3, 4]. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, la recurrencia y la formación de metástasis son la principal causa de muerte en las pacientes con cáncer de mama. Los mecanismos responsables de la invasión y metástasis no están completamente entendidos; sin embargo, está claro que los carcinomas derivados de tejidos epiteliales progresan a grados patológicos más avanzados de malignidad con una invasión local y metástasis a distancia más frecuentes [4, 5].

La metástasis es un proceso de múltiples etapas que pueden ser clasificadas en al menos cinco pasos secuenciales: 1) El desprendimiento y la migración de las células tumorales al

tejido adyacente, 2) la invasión de las células tumorales en el torrente sanguíneo y el tejido linfático (intravasación), 3) la sobrevivencia en la circulación (resistencia a la anoikis), 4) la invasión y la penetración de las células tumorales fuera de la circulación sanguínea y linfática (extravasación), 5) la colonización, proliferación y neo-vascularización de las células tumorales en sitios distantes [6]. En el fenómeno complejo de la diseminación de las células tumorales, uno de los primeros eventos importantes es la pérdida de la mayoría de las características epiteliales, a través de cambios drásticos en el citoesqueleto. Ésta serie de eventos se conoce como transición epitelio-mesénquima (TEM), el cual es un proceso en el que las células epiteliales sufren cambios bioquímicos para transformarse a células mesenquimatosas, se pierden las uniones intercelulares y por lo tanto se vuelven alargadas y no polarizadas, lo que les permite moverse a través de la matriz extracelular, con lo cual generan un nuevo tejido con una polaridad diferente al epitelio que le dio origen [7, 8]. La TEM no es un proceso exclusivo de las células tumorales, se ha descrito en 3 diferentes escenarios biológicos: La TEM tipo 1 está involucrada en la implantación del embrión, la embriogénesis y la organogénesis. La TEM tipo 2 está asociada a la cicatrización de heridas, regeneración tisular y fibrosis en órganos como el riñón; y la TEM tipo 3 es la que se encuentra implicada en la tumorigénesis, explicando la progresión de un carcinoma *in situ* a uno invasor [9]. También se ha asociado con la resistencia a la apoptosis y a fármacos de quimioterapia [10]. El papel de la TEM en cáncer ya está bien establecido, y se asume es un componente indispensable para la metástasis [11]. Una vez que las células tumorales alcanzaron el sitio de metástasis distante, retoman el fenotipo del tumor primario a través de un proceso llamado transición mesénquima-epitelio (TME). Por lo tanto, los pasos de la TEM parecen ser reversibles, indicando la existencia de componentes dinámicos en la progresión tumoral [12].

Se han descrito diversos marcadores implicados en la TEM, uno de los más estudiados es la disminución de la expresión de E-cadherina, proteína involucrada en uniones célula-célula, la cual se requiere para mantener uniones estables, y durante la TEM baja sus niveles al mínimo [13]. La pérdida de E-cadherina está asociada con mayor invasividad en cáncer y es considerada una característica distintiva del proceso de TEM. Concomitante a la pérdida de E-cadherina, se da un incremento en los marcadores mesenquimatosos como la N-cadherina, este proceso se conoce como intercambio de cadherinas [14]. Otros marcadores regulados de manera positiva característicos de un proceso de TEM son vimentina, fibronectina, actina de músculo liso; factores de transcripción como Snail, Twist, Slug y ZEB; además de factores de crecimiento como el factor derivado de plaquetas (PDGF, del inglés, platelet-derived growth factor) [15-18]. Otras moléculas de adhesión célula-célula como las claudinas 3, 4, 7, α -catenina, γ -catenina, ocludinas son reguladas negativamente en células con fenotipo mesenquimatoso [16, 18]. La pérdida de E-cadherina no se debe a mutaciones o deleciones en el gen de *e-cadherina*, solo se han reportado cambios epigenéticos y transcripcionales que silencian la expresión de E-cadherina, lo cual le permite re-expresarse tanto en el tumor primario o en metástasis [19]. La TEM es un proceso dinámico y es activado por diversos estímulos del microambiente tumoral que incluyen factores de crecimiento, interacciones célula tumoral-estroma e hipoxia [20]. Dentro de las señales que activan la TEM se encuentran factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés transforming growth factor beta), el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF, del inglés hepatocyte growth factor), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés fibroblast growth factor), los factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 (IGF 1 y 2, del inglés insulin growth factor) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés epidermal growth factor)

Existe evidencia suficiente acerca del papel de EGF y su receptor (EGFR) en procesos de metástasis en diferentes tumores [21-23]. La unión de EGF a su receptor induce diversas vías de señalización como son la activación de la proteína cinasa C-delta (PKC- δ), las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, del inglés mitogen-activated protein kinase), y fosfolipasa C- γ ; estas vías facilitan la migración celular [24, 25]. También se ha demostrado que la activación de EGFR induce la producción de metaloproteinasa 9, posiblemente a través de la vía de PI3K, que conlleva a la migración celular [26, 27]. Se ha demostrado que el tratamiento crónico con EGF en diversas líneas celulares de cáncer de mama, de pulmón de células no pequeñas y de próstata induce una regulación negativa de la E-cadherina y de las uniones de adhesión célula-célula [28, 29]. La hiperactivación de EGFR también ha sido reportada en múltiples tumores como el de colon, mama, próstata, cabeza y cuello [30]. En modelos murinos de cáncer de mama *in situ*, se ha demostrado que la sobreexpresión de EGFR es suficiente para inducir la transformación celular de un epitelio mamario normal y puede volverse metastásico una vez que terminaron la TEM, la cual depende de la habilidad de EGFR de fosforilar al transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT3, del inglés, signal transducer and activator of transcription 3) [31]. Estos y otros resultados sugieren que una señalización paracrina de EGF participa en la TEM [31, 32]. Por otra parte, está ampliamente demostrado que el EGF induce la pérdida de E-cadherina en diversas líneas celulares de tumores de mama, ovario, pulmón, y cabeza y cuello [29, 33-37].

Investigaciones recientes han establecido que STAT3 se encuentra constitutivamente activado en diversos tipos de cáncer y que juega un papel importante tanto en el desarrollo del tumor, como en la metástasis. STAT3 es un factor de transcripción que originalmente fue descrito como un transductor que llevaba las señales desde los receptores en la membrana de las células hasta el núcleo [38]. STAT3 se encuentra latente en el citoplasma

y es activado mediante fosforilación en el residuo de tirosina 705 (Y705), lo que induce su dimerización y posterior translocación al núcleo, donde se une a secuencias específicas del DNA, con la consecuente transcripción de sus genes blanco [38, 39]. La fosforilación de STAT3 esta mediada por diversos receptores con actividad de tirosina cinasa intrínseca como son EGFR, VEGFR y PDGFR, y algunas cinasa de tirosina no receptores como c-Src, Abl; y receptores de citocinas como el IL-6R o el receptor de Oncostatina M (OSMR), los cuales se encuentran asociados con una subunidad gp130 que se encuentra unida a cinasas Janus (JAKs, del inglés, Janus Kinase), siendo esta última la que lleva a cabo la fosforilación de STAT3 [38, 40]. La activación constitutiva de STAT3 es necesaria para mantener el fenotipo transformado en la mayoría de los tumores de mama, ovario, próstata, páncreas, tiroides, cabeza y cuello, melanoma, carcinoma hepático, renal, mieloma, linfomas y leucemias [41]. En cáncer, se ha demostrado que STAT3 participa activamente en diversos procesos biológicos como es la proliferación celular, la migración, la angiogénesis, la invasión y la metástasis [38]. En años recientes, se ha visto que STAT3 es un importante inductor de la TEM mediada por factores como la IL-6 y el EGF [34, 36, 42-44]. Una de la principales funciones de STAT3 en la TEM es inducir la transcripción de los factores de transcripción (Snail, Slug, Twist, Zeb1/2) necesarios para la represión de los marcadores epiteliales como la E-cadherina y la inducción de los marcadores mesenquimales como la vimentina y la N-cadherina [42]. Estos factores de transcripción se unen a la secuencia E-Box en el promotor de E-cadherina, reclutando co-represores transcripcionales y deacetilasas de histona para silenciar la expresión de E-cadherina[45].

Como ya se ha mencionado anteriormente, la metástasis es una de las principales causas de muerte de las pacientes con cáncer de mama. Por lo cual, en los últimos años se ha intensificado la investigación acerca de los mecanismos de señalización de la TEM, un mejor entendimiento de este proceso permitirá el desarrollo de nuevas estrategias

terapéuticas que puedan inhibir la transformación celular y el proceso de metástasis. Es de particular importancia reconocer el contexto fisiológico y la naturaleza dinámica del proceso de TEM para el desarrollo de nuevos fármacos que interfieran con esta. Recientemente, se utilizó a la Metformina, una biguanida utilizada en el tratamiento de la diabetes, para inhibir la TEM inducida por IL-6 en células de adenocarcinoma de pulmón. La Metformina indujo una inhibición parcial de la TEM, que se demostró por una readquisición de marcadores epiteliales y disminución de marcadores mesenquimatosos [46].

Estudios epidemiológicos han asociado el uso de la Metformina en pacientes diabéticos con una reducción en el riesgo de desarrollar múltiples tipos de cáncer entre ellos el de mama, próstata y páncreas [47-49]. Sin embargo, la reducción del riesgo es controversial en otras neoplasias, como en cáncer de vejiga en donde no se demostró ninguna asociación [50]. En cáncer de mama, un meta-análisis mostró una reducción en el riesgo de incidencia de este tipo de cáncer cuando el tratamiento con Metformina era por más de 3 años[51]; también se ha observado que en cáncer de mama triple negativo, la Metformina inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis bloqueando la fosforilación de STAT3 [52]. La Metformina es capaz de inducir un arresto parcial en la fase G1 del ciclo celular en células Luminal A, B y HER2+ [53]. El mecanismo de acción de la Metformina más estudiado es el que involucra a la seril-treonil-cinasa activada por AMP (AMPK, el inglés AMP-activated protein kinase), que se activa en situaciones de baja energía y funciona como un sensor metabólico, una vez que se activa incrementa los niveles de energía por disminución de las vías anabólicas y aumentando las vías catabólicas. AMPK es fosforilada por cinasa hepática B1 (LKB1, del inglés Liver Kinase B1) que es un supresor tumoral. La Metformina activa a la AMPK en el hígado, y probablemente en otros tejidos, por una reducción transitoria de la energía celular inducida por la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria de la mitocondria [54].

Conocer los mecanismos moleculares responsables de la TEM permitirá tener posibles blancos terapéuticos que puedan inhibir dicho proceso, este es un abordaje atractivo que podría inhibir el crecimiento tumoral, reducir las metástasis y atenuar la resistencia a fármacos. Por lo cual, en el presente trabajo se estudió el papel de la Metformina sobre la TEM inducida por EGF. Se utilizó un modelo de cultivos primarios de cáncer de mama (MBCDF y MBCD25) y la línea celular MCF-7, en la cuales se indujo la TEM con EGF, posteriormente se adicionó Metformina y se analizó la capacidad del fármaco de revertir la TEM por el efecto sobre la expresión de E-cadherina, N-cadherina y el factor de transcripción Snail. Los resultados demuestran que en cultivos primarios y en la línea MCF-7, la Metformina puede revertir la TEM inducida por EGF, re-expresando la E-cadherina y reprimiendo la expresión de N-cadherina y Snail. Estos resultados sugieren que la Metformina podría ser utilizada con la finalidad de revertir el proceso de TEM y disminuir la capacidad metastásica de los tumores de mama.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial y en nuestro país. El mayor impacto en la supervivencia de estas pacientes es el desarrollo de metástasis a distancia. La TEM parece ser uno de los puntos clave en el desarrollo de la metástasis, por lo cual, incidir en este punto sería un atractivo blanco terapéutico que permita bloquear el desarrollo de la metástasis.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial y en nuestro país. El desarrollo de invasión y metástasis impactan en la supervivencia de las mujeres con esta neoplasia.

Incidir en TEM, punto clave de la invasión celular, es un blanco terapéutico atractivo. Metformina ha demostrado inhibición de TEM mediada por IL-6 en cáncer de pulmón, sin embargo, el papel de esta biguanida en cáncer de mama y en TEM mediada por EGF no está explorado.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En células de cáncer de mama que han adquirido un fenotipo mesenquimatoso debido a una TEM mediada por EGF vía STAT3, ¿La Metformina puede la TEM en este modelo?

HIPÓTESIS

En células de cáncer de mama, el uso de la metformina revierte la TEM inducida por EGF, induciendo la re-expresión de E-cadherina y la represión de la expresión de N-cadherina y Snail.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Demostrar que Metformina puede revertir la TEM mediada por EGF en células de cáncer de mama

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Inducir TEM *in vitro* en células de cáncer mama mediante el uso de EGF, a través de la activación de STAT3.
2. Analizar los marcadores epiteliales (E-cadherina) y mesenquimales (N-cadherina) en células de cáncer de mama tratadas con EGF.
3. Analizar la expresión del factor de transcripción Snail en células de cáncer de mama tratadas con EGF.
4. Analizar el efecto de la Metformina sobre los marcadores de TEM en células de cáncer de mama previamente estimuladas con EGF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Factor de crecimiento epidérmico (Del inglés: Epidermal Growth Factor, EGF) fue obtenido de PeproTech (RockyHill, NJ, EUA). Metformina fue adquirida de MP Biomedicals (Santa Ana, CA, EUA). Se utilizaron los anticuerpos primarios contra E-cadherina, Tubulina, p-STAT3 (Tyr705) y STAT3 de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anti-Snail y anti-N-cadherina de Cell Signalling Technology (Cambridge, MA, EUA). Anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo se adquirieron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EUA).

Cultivo Celular

La línea celular humana MCF-7 se obtuvo de la ATCC®. Se utilizaron los cultivos primarios de cáncer de mama MBCDF y MBCD25 obtenidas a partir de biopsias de pacientes con cáncer de mama del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (protocolo aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Ref. 1549, BQO-008-06/9-1). Todos los cultivos fueron mantenidos en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, EUA) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Estimulación Celular

Para los ensayos de fosforilación de STAT3, las células MBCDF, MBCD25 y MCF-7 se sembraron a una densidad de 35 000 células/cm² en platos de cultivo de 60 mm mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con 0.1% de suero fetal bovino durante 24 h, las células se estimularon con 10 ng/ml de EGF por los siguientes tiempos: 0, 5, 15, 30 y 60 min. Para los ensayos de inducción de TEM, las células MBCD25, MBCDF y MCF-7 se sembraron a una densidad de 150,000 células/plato de cultivo de 60 mm (Corning®) y se estimularon con EGF 10 ng/ml, al día 3 se re-adicionó EGF a la misma concentración. Se obtuvieron botones celulares los días 0, 1, 3 y 5. Para los ensayos donde se co-estimuló con EGF y Metformina, las células se trataron con EGF 10 ng/ml durante 5 días, con re-adición de EGF al día 3. En el día 5 a una condición se le adicionó Metformina 10mM con 10 ng/ml EGF y otro se mantuvo solo con EGF, se obtuvieron botones celulares a los días 7 y 9.

Ensayo de Inmunoblot (Western Blot)

Las células fueron lisadas en un buffer que contiene HEPES 50mM (pH 7.4), EDTA 1mM, NaCl 250 mM, Nonidato P-40 1%, NaF 10 mM, Vanadato de sodio 1 mM e inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free, Roche). 25 µg de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y fueron transferidos a membrana Immobilon-P PVDF (Millipore Corp. Bedford, MA, EUA). Las membranas fueron bloqueadas durante 60 minutos con leche al 5% en PBS-Tween 0.05%. Posteriormente fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios Tubulina, pSTAT3, STAT3, E-cadherina, N-cadherina y Snail durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se incubaron por 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado a HRP. La señal fue visualizada mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Pico (Thermo, Rockford, IL, EUA) y se expuso a una película radiográfica (Kodak).

RESULTADOS

EGF induce fosforilación de STAT3 en la Y705 en células de cáncer de mama.

Se ha demostrado que la unión del EGF a su receptor induce la activación de STAT3 [42]. Para analizar si la estimulación con EGF induce la activación de STAT3 en células de cáncer de mama, estimulamos a las células MBCDF, MBCD25 y MCF7 con este factor. La fosforilación de STAT3 (Y705) fue analizada por Western blot (Figura 1). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con EGF indujo la fosforilación de STAT3 con respecto al tiempo. Las células MBCDF, MBCD25 tienen un pico de activación a los 5 minutos, mientras que en las MCF-7 se observó el máximo de activación a los 15 minutos (Figura 1, panel superior). El tratamiento con EGF a estos tiempos no provocó cambios en la cantidad de STAT3 total (Figura 1, panel medio). La tubulina fue utilizada como control de carga (Figura 1, panel inferior). Estos resultados demuestran que la cinética de fosforilación de STAT3 (Y705) inducida por EGF es diferente para cada una de las células

de cáncer de mama con un intervalo de 5 a 15 minutos tanto en cultivos primarios como en líneas celulares de cáncer de mama.

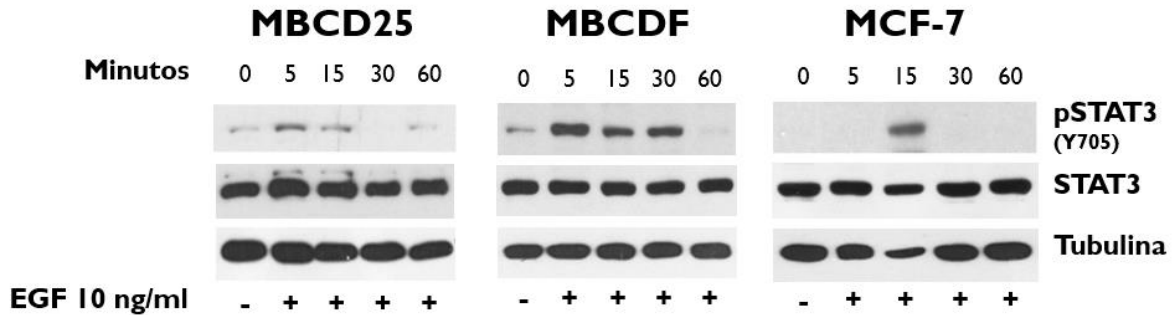


Figura 1. EGF induce fosforilación de STAT3 en las células de cáncer de mama MBCDF, MBCD25 y MCF-7. Las células de cáncer de mama MBCD25, MBCDF, y MCF-7 se trataron con EGF 10 ng/ml a los tiempos 0, 5, 15, 30 y 60 min. Se realizó Western blot para analizar la fosforilación de pSTAT3 (Y705) usando anticuerpos fosfo-específicos (panel superior). La cantidad total de STAT3 se analizó usando un anticuerpo anti-STAT3 (panel medio). Tubulina fue utilizado como control de carga de la proteína total (panel inferior).

EGF induce TEM *in vitro* en células de cáncer de mama.

Una vez que demostramos que EGF fosforila a STAT3 en las células de cáncer de mama, analizamos si el tratamiento con EGF induce la TEM en las células MBCD25 y MBCDF. La TEM fue evaluada como la pérdida de E-cadherina mediante Western blot. Nuestros resultados muestran que el tratamiento continuo con EGF por cinco días indujo una disminución de la expresión de E-cadherina con respecto al tiempo de tratamiento, siendo indetectable por este método al día 5. (Figura 2A, panel superior izquierdo y derecho). La tubulina fue utilizada como control de carga (Figura 2A, panel inferior izquierdo y derecho). Se realizó un experimento similar con la línea celular MCF-7, el cual también se observa la pérdida de E-cadherina al día 5 (Figura 2B, panel superior). En estas células también se analizó el comportamiento del factor de transcripción Snail, el cual aumento su expresión con respecto al tiempo de tratamiento con EGF (Figura 2B, panel medio). La tubulina se usó como control de carga (Figura 2B, panel inferior). Estos resultados muestran que el

tratamiento con EGF induce la pérdida de E-cadherina en las células de cáncer de mama, por lo cual se considera que realizaron la TEM. Esto se ve mejor sustentado en las células MCF-7 en donde además de la pérdida de E-cadherina mediada por EGF, hay un incremento de Snail que es el encargado de reprimir la expresión de E-cadherina.

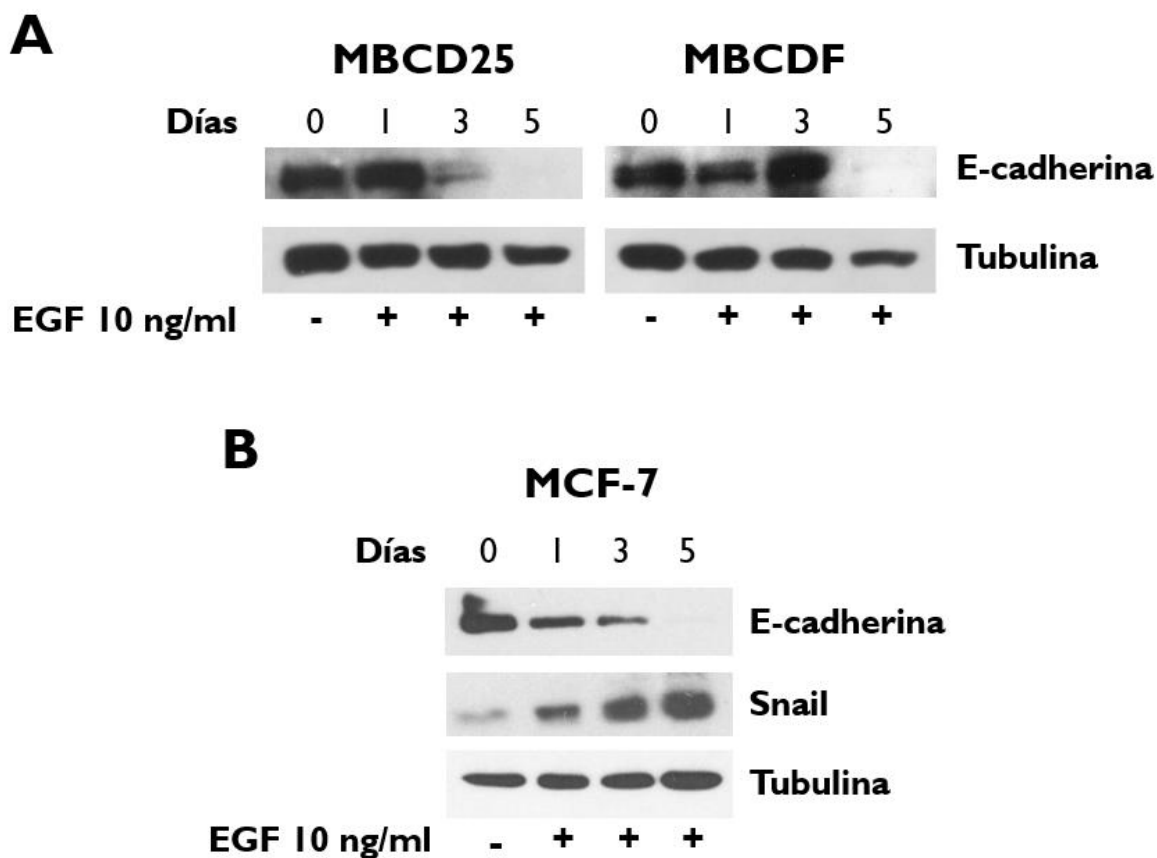


Figura 2. EGF induce la pérdida de expresión de E-cadherina y aumento de la expresión de Snail en células MBCDF, MBCD25 y MCF-7. **A.** Las células de cáncer de mama MBCD25 y MBCDF se trataron con EGF 10 ng/ml a los días 0 y 3. Se realizó Western blot para analizar la expresión de E-cadherina (panel superior). Tubulina fue utilizado como control de carga de la proteína total (panel inferior). **B.** La línea celular MCF-7 se trató con EGF 10 ng/ml los días 0 y 3. Se realizó Western blot para analizar la expresión de E-cadherina (panel superior) así como para analizar la expresión de Snail (panel medio). Tubulina fue utilizado como control de carga de la proteína total (panel inferior).

Metformina revierte TEM inducida por EGF en células de cáncer de mama

Una vez que demostramos que el tratamiento con EGF induce la TEM, con una pérdida significativa de E-cadherina y un aumento en la expresión de Snail, estudiamos si la Metformina tiene algún efecto sobre la TEM que previamente había sido inducida por EGF

en las células de cáncer de mama MBCDF, MBCD25 y MCF7. Las células fueron tratadas con EGF de manera similar al experimento anterior y al día 5 se adicionó Metformina 10 mM por 4 días más. La expresión de E-cadherina se mantiene reprimida por el tratamiento con EGF solo, mientras que la adición de Metformina junto con EGF a partir del día 5 induce una re-expresión de E-cadherina analizada al día 7 y 9 en las células MBCD25 y MBCDF (Figura 3A, panel superior izquierdo y derecho). En contraste, la N-cadherina, un marcador mesenquimatoso, se incrementó con el tratamiento continuo de EGF y disminuyó con el tratamiento con la Metformina y el EGF juntos (Figura 3A, panel medio izquierdo y derecho). Un experimento similar en las células MCF-7 mostró resultados parecidos en cuanto a la re-expresión de E-cadherina cuando las células se trataron con Metformina y EGF juntos (Figura 3B, panel superior). Por otra parte, en las células MCF-7 se analizó la expresión de Snail en estas condiciones, observándose un aumento de este factor de transcripción cuando solo se trató con EGF y disminución de su expresión cuando la células se trataron de manera conjunta con Metformina y EGF (Figura 3B, panel medio). La tubulina fue utilizada como control de carga en todos los casos (Figura 3A y 3B, panel inferior).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo estudiamos el papel de la Metformina sobre la TEM en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama. En primer lugar analizamos la activación de STAT3 mediada por EGF en células de cáncer de mama MBCD25, MBCDF y MCF-7. Nuestros datos mostraron que en las células de cáncer de mama STAT3 se activa con cinéticas diferentes para cada tipo de cultivo celular utilizado. Posteriormente,

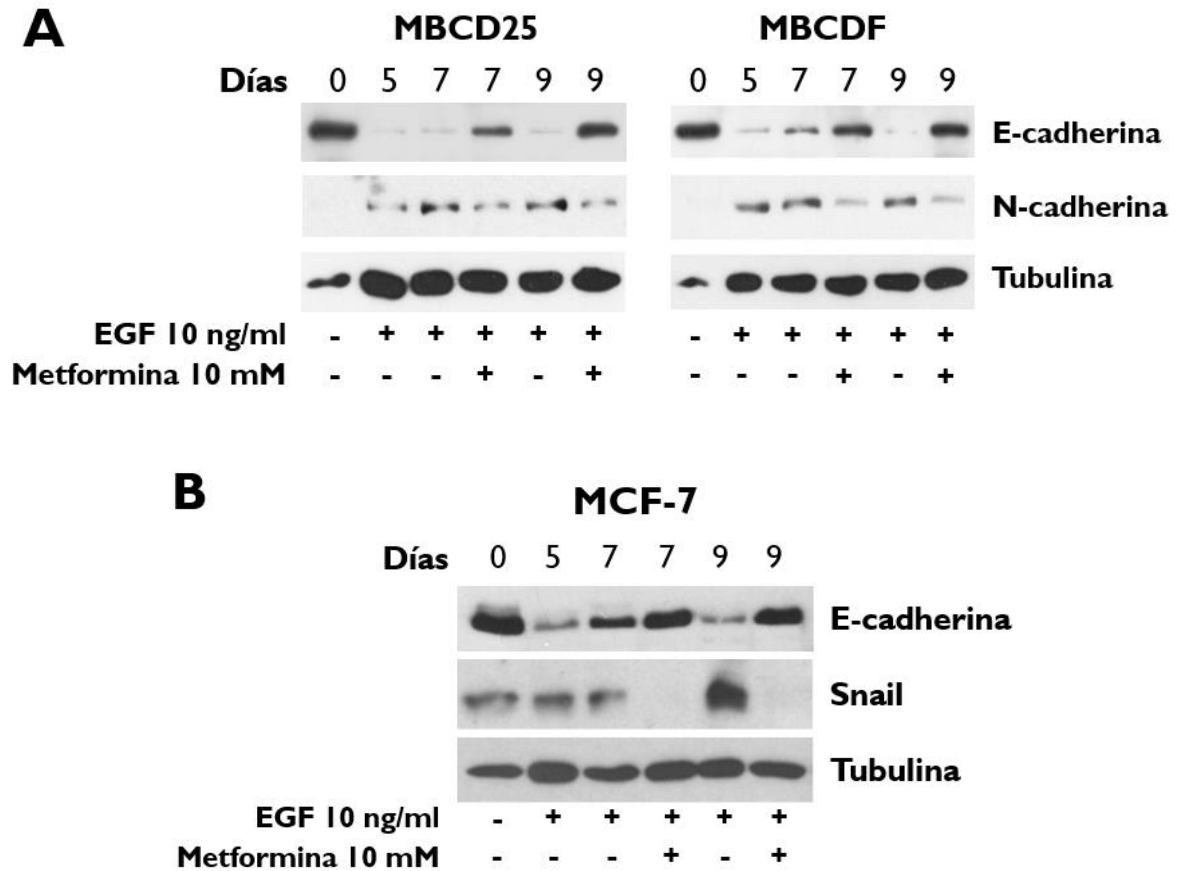


Figura 3. La Metformina revierte los marcadores de TEM en células de cáncer de mama. A. Las células de cáncer de mama MBCD25 y MBCDF se trataron con EGF 10 ng/ml a los días 0, 3, 5 y 7. Al día 5 se adicionó a una condición EGF 10 ng/ml más Metformina 10 mM con re-adición al día 7. Se realizó Western blot para analizar la expresión de E-cadherina (panel superior), así como la expresión de N-cadherina (panel medio). Tubulina fue utilizado como control de carga de la proteína total (panel inferior). **B.** La línea celular MCF-7 se trató como en A. Se realizó Western blot para analizar la expresión de E-cadherina (panel superior), así como la expresión de Snail (panel medio). Tubulina fue utilizado como control de carga de la proteína total (panel inferior).

en el mismo panel de células se estudió la inhibición de la expresión de E-cadherina, así como la inducción del factor de transcripción Snail mediada por EGF. Los resultados mostraron que el EGF induce la pérdida de E-cadherina con un concomitante aumento de Snail, lo que indica que las células se indujeron a una TEM. Finalmente, las células de cáncer de mama fueron tratadas con EGF para inducir una TEM y después se adicionó Metformina al tratamiento de EGF y se analizó su efecto sobre los marcadores de TEM.

Observamos que la Metformina induce la re-expresión de E-cadherina, así como una disminución de la expresión de N-Cadherina y de Snail.

La TEM se caracteriza por cambios bioquímicos en el citoesqueleto de las células, uno de los principales marcadores de la TEM es la pérdida de E-cadherina, un marcador epitelial, que funciona para mantener la adhesión célula-célula en los tejidos epiteliales. Una vez que las células perdieron la E-cadherina, este es un evento que indica que las células experimentaron una TEM. En nuestro modelo el EGF induce una pérdida de E-cadherina como ya está previamente reportado tanto para el cáncer de mama, como para otros tipos de cáncer [29, 33-37]. La pérdida de E-cadherina está mediada por una acción represora de factores de transcripción como Snail, Twist y Slug, los cuales son inducidos por la acción de STAT3 [42, 44]. En nuestro sistema Snail incrementó sus niveles por acción de EGF y como ya habíamos demostrado, el EGF activó a STAT3, el cual probablemente indujo la transcripción de Snail y este a su vez reprimió la expresión de E-cadherina.

La TEM es una de los pasos indispensables para la metástasis de las células cancerosas, por esta razón, en los últimos años las investigaciones en esta área se han enfocado en entender el proceso de TEM y cómo interferir con este proceso. Recientemente, se demostró que la Metformina puede inhibir la TEM mediada por IL-6, probablemente por el bloqueo de la fosforilación de STAT3 [46]. A diferencia de este y otros trabajos, nuestro estudio constituye un modelo único, ya que primero se induce la TEM con EGF en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama y posteriormente se analiza el efecto de la Metformina sobre su capacidad de interferir con la TEM.

CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos en los cultivos primarios y líneas celulares de cáncer de mama que la Metformina induce la re-expresión de E-cadherina e inhibición de Snail y N-Cadherina. Por lo tanto, la Metformina en nuestro modelo es capaz de revertir la TEM mediada por EGF. Estos resultados apoyan el uso potencial de la Metformina de manera simultánea a otros tratamientos de quimioterapia. Estos resultados sugieren que la Metformina inhibe la TEM, la cual es uno de los pasos críticos de la metástasis. Finalmente, la Metformina podría ser una alternativa de tratamiento para bloquear el potencial metastásico, la resistencia a fármacos de quimioterapia, y la recurrencia tumoral, los cuales están asociados a un pobre pronóstico en cáncer de mama.

REFERENCIAS

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Chavarri-Guerra, Y., et al., *Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system*. Lancet Oncol, 2012. **13**(8): p. e335-43.
3. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. Mol Oncol, 2011. **5**(1): p. 5-23.
4. von Minckwitz, G., et al., *Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes*. J Clin Oncol, 2012. **30**(15): p. 1796-804.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
7. Nantajit, D., D. Lin, and J.J. Li, *The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance*. J Cancer Res Clin Oncol, 2014.

8. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
9. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
10. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 117-34.
11. Christiansen, J.J. and A.K. Rajasekaran, *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8319-26.
12. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 374-83.
13. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
14. Maeda, M., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock, *Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 873-87.
15. Sethi, S., et al., *Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis*. Am J Transl Res, 2010. **3**(1): p. 90-9.
16. Gurzu, S., et al., *Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update*. World J Clin Cases, 2015. **3**(5): p. 393-404.
17. Wu, Z.Q., et al., *Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(41): p. 16654-9.
18. Rito, M., et al., *Fibromatosis-like metaplastic carcinoma of the breast has a claudin-low immunohistochemical phenotype*. Virchows Arch, 2014. **465**(2): p. 185-91.
19. Yates, C.C., et al., *Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin*. Br J Cancer, 2007. **96**(8): p. 1246-52.
20. Wang, Y. and B.P. Zhou, *Epithelial-mesenchymal Transition---A Hallmark of Breast Cancer Metastasis*. Cancer Hallm, 2013. **1**(1): p. 38-49.
21. Verbeek, B.S., et al., *Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts*. FEBS Lett, 1998. **425**(1): p. 145-50.

22. Matsuo, M., H. Sakurai, and I. Saiki, *ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows antimetastatic activity using a hepatocellular carcinoma model*. *Mol Cancer Ther*, 2003. **2**(6): p. 557-61.
23. Weber, K.L., et al., *Blockade of epidermal growth factor receptor signaling leads to inhibition of renal cell carcinoma growth in the bone of nude mice*. *Cancer Res*, 2003. **63**(11): p. 2940-7.
24. Kruger, J.S. and K.B. Reddy, *Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells*. *Mol Cancer Res*, 2003. **1**(11): p. 801-9.
25. Thomas, S.M., et al., *Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2003. **63**(17): p. 5629-35.
26. Ellerbroek, S.M., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association*. *Cancer Res*, 2001. **61**(5): p. 1855-61.
27. Kondapaka, S.B., R. Fridman, and K.B. Reddy, *Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 1997. **70**(6): p. 722-6.
28. Lu, Z., et al., *Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion*. *Cancer Cell*, 2003. **4**(6): p. 499-515.
29. Ackland, M.L., et al., *Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells*. *Lab Invest*, 2003. **83**(3): p. 435-48.
30. Normanno, N., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. *Gene*, 2006. **366**(1): p. 2-16.
31. Wendt, M.K., J.A. Smith, and W.P. Schiemann, *Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression*. *Oncogene*, 2010. **29**(49): p. 6485-98.
32. Wyckoff, J., et al., *A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 7022-9.
33. Nickel, A. and S.C. Stadler, *Role of epigenetic mechanisms in epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells*. *Transl Res*, 2015. **165**(1): p. 126-42.

34. Lo, H.W., et al., *Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression*. *Cancer Res*, 2007. **67**(19): p. 9066-76.
35. Davis, F.M., et al., *Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent*. *Oncogene*, 2014. **33**(18): p. 2307-16.
36. Yue, P., et al., *Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signaling promote enhanced colony-forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(18): p. 2309-22.
37. Scheel, C., et al., *Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast*. *Cell*, 2011. **145**(6): p. 926-40.
38. Kamran, M.Z., P. Patil, and R.P. Gude, *Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 421821.
39. Akira, S., et al., *Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway*. *Cell*, 1994. **77**(1): p. 63-71.
40. You, L., et al., *The role of STAT3 in autophagy*. *Autophagy*, 2015. **11**(5): p. 729-39.
41. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 as an oncogene*. *Cell*, 1999. **98**(3): p. 295-303.
42. Wendt, M.K., et al., *STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas*. *JAKSTAT*, 2014. **3**(1): p. e28975.
43. Sullivan, N.J., et al., *Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells*. *Oncogene*, 2009. **28**(33): p. 2940-7.
44. Colomiere, M., et al., *Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas*. *Br J Cancer*, 2009. **100**(1): p. 134-44.
45. de Herreros, A.G., et al., *Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010. **15**(2): p. 135-47.
46. Zhao, Z., et al., *Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e95884.
47. Bodmer, M., et al., *Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(6): p. 1304-8.
48. Li, D., et al., *Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(2): p. 482-8.

49. Wright, J.L. and J.L. Stanford, *Metformin use and prostate cancer in Caucasian men: results from a population-based case-control study*. *Cancer Causes Control*, 2009. **20**(9): p. 1617-22.
50. Mamtani, R., et al., *Incidence of bladder cancer in patients with type 2 diabetes treated with metformin or sulfonylureas*. *Diabetes Care*, 2014. **37**(7): p. 1910-7.
51. Col, N.F., et al., *Metformin and breast cancer risk: a meta-analysis and critical literature review*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **135**(3): p. 639-46.
52. Deng, X.S., et al., *Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(2): p. 367-76.
53. Alimova, I.N., et al., *Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(6): p. 909-15.
54. Viollet, B., et al., *Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview*. *Clin Sci (Lond)*, 2012. **122**(6): p. 253-70.