



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

**“Papel de la fosfatasa PTP1B en la transición epitelio-
mesénquima (TEM) inducida por IL-6 en cultivos primarios
de cáncer de mama”**

TESIS

Para obtener el título de la especialidad en
ONCOLOGÍA MÉDICA

Presenta:

DR. HÉCTOR DE LA MORA MOLINA

TUTORA

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ

CO-TUTORES

DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ

DR. EUCARIO LEÓN RODRIGUEZ



Ciudad de México, 2017



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.

APROBACIÓN DE LA TESIS

"Papel de la fosfatasa PTP1B en la transición epitelio-mesénquima (TEM) inducida por IL-6 en cultivos primarios de cáncer de mama"



DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES

Director de enseñanza

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

Profesor titular de curso de especialización en oncología médica

Co-tutor de tesis

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ

Investigadora en ciencias médicas

Tutora de tesis

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ

Investigador en ciencias médicas

Co-tutor de tesis

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DEDICATORIA

A los pacientes con cáncer del Instituto

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por el apoyo incondicional y por ser un pilar fundamental en mi vida

A Gaby por estar conmigo estos meses y ser la mejor compañera

*A mis maestros y compañeros de oncología que durante estos 3 años hemos trabajado en favor
de un mejor quehacer profesional*

*A la Dra. Ibarra y el Dr. Esparza por estos 6 meses de conocimientos, por su paciencia y esfuerzo
en este trabajo.*

Abreviaturas

Abl	Protooncogen ABL (del inglés Abelson tyrosine-protein kinase 1)
Akt	Cinasa de serina y treonina AKT1
cDNA	ADN complementario (del inglés complementary deoxyribonucleic acid)
c-Src	Protooncogen SRC (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés Epidermal Growth Factor)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (abrev del inglés epidermal growth factor receptor)
ER	Receptor de estrógenos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés fibroblast growth factor)
GP130	Glicoproteína 130
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés human epidermal growth factor receptor 2)
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos (del inglés hepatocyte growth factor)
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina (del inglés insulin growth factor)
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Receptor de la Interleucina
JAK	Cinasa de janus 2 (del inglés Janus kinase 2)
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinasa)
PDGFR	Factor de crecimiento de derivado de plaquetas (del inglés platelets derivated growth factor)
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa (del inglés Phosphoinositide 3-kinase)
PR	Receptor de progestagenos
PTP1B	Proteína fosfatasa de tirosina tipo 1B (del inglés protein-tyrosine phosphatase)
shRNAs	del inglés short hairpin RNA
STAT3	Transductor de señales y activador de transcripción 3 (del inglés Signal Transducer and Activator of Transcription 3)
TEM	Transición epitelio mesenquima
TGF- β	Factor de crecimiento de transformante beta (del inglés transforming growth factor beta)
TME	Transición mesénquima epitelio
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés Vascular endotelial growth factor)
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés Vascular endotelial growth factor receptor)

1	Introducción	6
1.1	Epidemiología del cáncer de mama	6
1.2	Transición epitelio mesénquima	7
1.3	La IL-6 como estimulador de la TEM	9
1.4	Funciones de la fosfatasa PTP1B	11
2	Definición del problema y justificación	14
3	Pregunta de investigación	14
4	Hipótesis.....	14
5	Objetivos	15
5.1	Objetivo general	15
5.2	Objetivos específicos.....	15
6	Materiales y métodos	16
6.1	Cultivos primarios de células de cáncer de mama	16
6.2	Reactivos	16
6.3	Western Blot.....	16
6.4	Transfecciones.....	17
7	Resultados	18
7.1	Expresión basal de la fosfatasa PTP1B y marcadores de TEM en cultivos primarios de cáncer de mama.....	18
7.2	Efecto de dosis crecientes de IL-6 sobre la TEM en cultivos primarios de cáncer de mama	19

7.3 Efecto de un curso temporal de IL-6 por cuatro días induce la TEM a través de la fosforilación de STAT3 e induce la expresión de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama PTP1B negativos.....	20
7.4 La sobreexpresión de la fosfatasa PTP1B induce la TEM en cultivos primarios de cáncer de mama PTP1B negativas de manera independiente a la estimulación con IL-6.....	22
7.5 El silenciamiento de la PTP1B revierte las características mesenquimales de las células PTP1B positivas de los cultivos primarios de cáncer de mama.....	23
8 Discusión y conclusiones	25
10 Referencias	28

Resumen

Antecedentes: El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres y esta se debe principalmente por la diseminación a distancia. Para que suceda la metástasis son necesarios cambios profundos en la morfología de la célula que le permiten migrar, a estos cambios se les conoce como transición epitelio-mesénquima (TEM). A la fecha se han descrito diversos estímulos como inductores de la TEM, por lo que el conocimiento de los mecanismos que regulan estas vías es indispensable para incidir en los procesos de migración y metástasis. Uno de los reguladores de este proceso es la fosfatasa de tirosina 1B (PTP1B) que tiene un papel importante dentro de la fisiopatología del cáncer, aunque su función no se encuentra bien definida se ha asociado tanto como promotor y supresor de tumores, su papel en la TEM no está bien definido. Por lo cual, estudiar cual es la función de PTP1B en la TEM favorecerá el desarrollo de estrategias que influyan en la regulación de esta.

Métodos: Se utilizaron cultivos primarios de cáncer de mama obtenidos de pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (MBCDF, MBCD17, MBCD18, MBCDF-B3 y MBCDF-D5). Se indujo la TEM utilizando diversas concentraciones de Interleucina (IL-6) y por varios tiempos. Se realizaron transfecciones para sobreexpresar o silenciar PTP1B utilizando un plásmido que contiene el cDNA de PTP1B silvestre o shRNAs dependiendo del caso. Mediante la técnica de Western blot se evaluó la expresión de los marcadores y factores de transcripción asociados a la TEM así como la fosforilación de STAT3.

Resultados: En la caracterización de las células de cáncer de mama, encontramos que las células PTP1B negativas (MBCD17, MBCDF, MBCD18) se asocian con un fenotipo epitelial; mientras que las células PTP1B positivas (MBCDF-B3 y MBCDF-D5) presentan características de mesénquima. En las células PTP1B negativas estimuladas con IL-6 se indujo la represión de E-cadherina, así como la expresión de N-cadherina y vimentina. Por otro lado, se observó de manera concomitante a la TEM la expresión de Snail y represión de Slug. La estimulación con IL-6 promovió la fosforilación de STAT3 y se observó aumento en la expresión

de la PTP1B. La sobre-expresión de PTP1B induce la TEM de manera independiente a la estimulación con IL-6. Además, el silenciamiento de PTP1B disminuyó la expresión los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina.

Conclusión: En nuestro modelo de cultivos primarios de cáncer de mama, la estimulación con IL-6 indujo la TEM a través de la vía STAT3 con aumento en la expresión de PTP1B. La sobreexpresión de PTP1B promueve la TEM independientemente de un estímulo que induzca la TEM, mientras que su silenciamiento revierte el fenotipo de mesénquima. Estos resultados sugieren que PTP1B parece tener un papel como promotor de la TEM asociado a un estado metastásico más agresivo.

1 Introducción

1.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama representa la principal causa de cáncer en mujeres correspondiendo al 29 % de los nuevos casos y la segunda causa de muerte por cáncer con un 14 %, solo precedida por cáncer de pulmón [1]. En México desde el 2006 el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente. Los datos presentados por GLOBOCAN en 2012 reportan una incidencia de 35.4 casos de cáncer por cada 100,000 personas año y se estima que para el 2030 en México existirán 24 386 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y 9778 (40%) de estos casos fallecerán por la enfermedad. La incidencia y mortalidad se encuentran en incremento reportándose un riesgo anual estimado de 2 % en 1980 a un 5 % para el 2010; sin embargo, la incidencia real se desconoce debido a la ausencia de un registro nacional de cáncer. Una revisión reciente muestra que existe un incremento en la incidencia y la mortalidad del 2001 al 2011, la cual es predominantemente después de los 60 años [2]. El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, existen alrededor de 21 subtipos histológicos [luminal A, luminal B, normal-like, sobre-expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico-2 (HER2) y basal-like], los cuales son biológicamente diferentes respecto a su evolución, respuesta al tratamiento y pronóstico [3]. El factor pronóstico más importante es la etapa clínica del tumor al diagnóstico, ya que a mayor estadio clínico, la supervivencia a 5 años disminuye considerablemente. La supervivencia a 5 años en enfermedad localizada, regional y a distancia es de 99 %, 85 %, 26% respectivamente. En México, el 78 % de los casos se diagnostica con enfermedad localmente avanzada con supervivencias libres de progresión a 3 años de 44 % y supervivencia global del 80 %, similar a las reportadas en la literatura [4].

Los diferentes subtipos moleculares demuestran la heterogeneidad del cáncer de mama; por esta razón, en los últimos años se han investigado más de 100 marcadores pronósticos para cáncer de mama. A pesar de esto, son pocos los marcadores caracterizados y validados [5]. Entre los marcadores pronósticos se

encuentran oncogenes como HER2 y ciclina D1, cuya amplificación o sobreexpresión se relaciona con mayor agresividad tumoral, y genes supresores como el gen *Tp53*, que posee funciones indispensables para el control del ciclo celular, cuya alteración se asocia a neoplasias más agresivas [6, 7]. Los marcadores pronósticos y predictivos de uso clínico para el cáncer de mama son: los receptores de estrógenos (ER), los receptores de progesterona (PR) y el receptor HER2. Los estudios publicados sobre los genes *her2/neu* y *Tp53* les confieren valor pronóstico para el intervalo libre de enfermedad y supervivencia global; así mismo, les confiere valor predictivo indispensable en la terapia neo- y adyuvante. Ambos marcadores se han relacionado con mala respuesta al tratamiento con tamoxifeno, inhibidores de aromatasa y regímenes específicos de quimioterapia [6, 7].

1.2 Transición epitelio mesénquima

El cáncer presenta características distintivas, en la cual las células adquieren algunas capacidades biológicas para el desarrollo de los tumores, como son una proliferación sostenida a través de producción de factores de crecimiento y mutaciones en sus receptores, regulación negativa de supresores del crecimiento, inducción de angiogénesis, la resistencia a la apoptosis y la capacidad de degradar la matriz extracelular, lo que le permite a las células migrar a través de la conversión de una morfología epitelial/poligonal a una morfología fibroblástica [8]. La capacidad de invasión y metástasis es la causa principal de muerte en los pacientes con cáncer. La metástasis es un proceso de múltiples etapas que requiere 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 [9]. 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. Uno de los primeros eventos en la TEM es la pérdida de las uniones intercelulares y por lo tanto las células se vuelven alargadas y no polarizadas, permitiéndoles moverse a través de la matriz extracelular, con lo cual generan un nuevo tejido con una polaridad diferente al epitelio que les dio origen [10, 11]. La TEM no es un proceso exclusivo de las células tumorales, se han descrito 3 tipos: 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 hígado; 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 [12], también se ha asociado con la resistencia a la apoptosis y a fármacos de quimioterapia [13]. El papel de la TEM en cáncer está siendo ampliamente estudiado, y se asume es un componente indispensable para la metástasis [14]. Una vez que las células tumorales alcanzaron el sitio de metástasis, retoman el fenotipo parecido al 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 [15].

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 baja sus niveles al mínimo, con un intercambio por N-cadherina. Existen otros marcadores que son regulados positivamente en la TEM como son: vimentina, fibronectina, actina de músculo liso; así como, los factores de transcripción Snail, Twist, Slug y ZEB1/2 [16-19]. La pérdida de E-cadherina es uno de los marcadores principales de la TEM y cabe destacar que el gen de la *e-cadherina* no sufre deleciones o mutaciones, solo se han encontrado cambios epigenéticos y transcripcionales que silencian su expresión, lo cual le permite

re-expresarse en los sitios de metástasis [20]. La TEM es un proceso dinámico que es activado por diversos estímulos provenientes del microambiente tumoral los cuales incluyen factores de crecimiento, interacciones célula tumoral-estroma e hipoxia [21]. Dentro moléculas 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-like Growth Factor) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor) [22].

1.3 La IL-6 como estimulador de la TEM

Otra de las moléculas que ha sido implicada en progresión tumoral es la IL-6, esta es una citocina pleiotrópica producida por las células hematopoyéticas y células epiteliales. Desde su identificación en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares, se describió su papel en funciones biológicas como diferenciación de linfocitos B y proliferación de linfocitos T [23, 24]. En cáncer de mama, riñón, próstata y mieloma múltiple se ha correlacionado con mal pronóstico y agresividad tumoral, estudios recientes sitúan a la IL-6 como un regulador positivo del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [25, 26]. Se ha encontrado que los niveles circulantes de IL-6 en pacientes con cáncer de mama son 10 veces mayor que en mujeres sanas, existiendo una correlación entre mayores niveles de IL-6 con estadios más avanzados del cáncer de mama [25, 27]. El estudio de la IL-6 en células de cáncer de mama *in vitro* ha arrojado resultados controversiales; por una parte, se ha demostrado su implicación en resistencia a doxorubicina y la promoción de la motilidad celular requerida para la metástasis [28, 29]; y por otra, se ha visto que el tratamiento con IL-6 a bajas dosis inhibe la proliferación *in vitro* vía activación de la apoptosis por fragmentación del DNA en células con expresión del receptor de estrógenos [30]. La IL-6 también ha sido implicada como un promotor de la TEM reprimiendo la expresión de E-cadherina [31].

La señalización de la IL-6 es a través de la unión a su receptor (IL-6R) y a la glicoproteína de unión a membrana, gp130, que se encuentra unida a las cinasas janus 1,2 (JAK1,2 del inglés Janus kinase). Las JAKs se encargan de fosforilar el dominio citoplásmico distal de la gp130, esta fosforilación sirve para reclutar proteínas que contienen dominios SH2, como STAT3. 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 [32]. STAT3 se encuentra latente en el citoplasma y es activado mediante fosforilación en el residuo de tirosina 705 (Y705) [24, 32-34] induciendo su dimerización y posterior translocación al núcleo, donde se une a secuencias específicas del DNA, con la consecuente transcripción de sus genes blanco [32, 35]. 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 [32, 36]. 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 [37]. Además, 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 [32]. 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 [38-42]. En la TEM mediada por IL-6, STAT3 induce la expresión de otros factores de transcripción (Snail, Slug, Twist, Zeb1/2) que en común inducen la represión de la E-cadherina y transcripción de genes mesenquimales como *n-cadherina* y *vimentina*, lo que genera la desintegración de las uniones celulares y pérdida de la polaridad epitelial [43]. Reportes recientes, destacan la importancia oncogénica de la activación persistente de STAT3, proponiendo a la producción autocrina y a la estimulación paracrina de IL-6 como el mecanismo de la activación constitutiva de STAT3. En el microambiente tumoral, y los frentes invasivos tumorales, se ha observado la presencia de células

inflamatorias, las cuales secretan esta citocina, por lo cual propone a la IL-6 como agente tumorigénico a través de la activación de la vía de JAK/STAT [15, 37].

1.4 Funciones de la fosfatasa PTP1B

Las vías de señalización antes mencionadas son reguladas por fosforilación en residuos de tirosina, la cual está controlada por la acción coordinada de las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas. Las cinasas de tirosina adicionan grupos fosfato a residuos de tirosina en un gran número de proteínas, mientras que las fosfatasas de tirosina o PTPs (del inglés: protein tyrosine phosphatase) defosforilan residuos de fosfotirosina en sustratos específicos. El balance entre cinasas y fosfatasas determina el estado de fosforilación de los componentes de las vías de señalización, un desbalance en cualquiera de estos dos grupos de proteínas conlleva a enfermedades como Alzheimer, diabetes, obesidad y cáncer entre otras [44]. La superfamilia de las PTPs está conformada por fosfatasas similares a receptores y no receptores, son altamente específicas, fuertemente reguladas, son importantes reguladores de tanto la iniciación, como la terminación de la señalización intracelular [45]. En 1988, Tonks NK y colaboradores clonaron y purificaron la primera fosfatasa de tirosina a partir de placenta humana, la cual llamaron PTP1B [46]. Esta fosfatasa pesa 50 kDa y contiene un dominio catalítico de 37 kDa hacia el extremo N-terminal seguido de una región reguladora y un dominio de localización a la cara externa del retículo endoplásmico, este último dominio regula el acceso a los sustratos que PTP1B puede defosforilar [47]. La delección del gen de *Ptpn1* en ratones causa incremento en la susceptibilidad a la insulina y aumenta la tolerancia a la glucosa, cuando se alimentó a los ratones knock-out de PTP1B con una dieta alta en grasa mostraron un resistencia a ganar peso [48]. Estos hallazgos impulsaron el desarrollo de inhibidores específicos para PTP1B para el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo 2. Estos inhibidores se han quedado en fases pre-clínicas debido a problemas de especificidad [49-51]. Por otra parte, el continuo estudio de las funciones de PTP1B ha demostrado que no solo es un regulador negativo del receptor de insulina, también participa en la

señalización de diversos receptores como el receptor de leptina, PDGF y HGF. Otros sustratos descritos para PTP1B son miembros de la familia de JAK/STATs, principalmente JAK2 y Tyk2 en respuesta a interferón alfa y gamma [52].

PTP1B tiene un papel importante dentro de la fisiopatología del cáncer, aunque su función no se encuentra bien definida; existe evidencia que propone a PTP1B como promotor de tumores; pero, también hay reportes que sitúan a PTP1B como supresor de tumores [53]. En el caso del cáncer de mama, existen varios estudios que han asociado a PTP1B con la regulación de la señalización de HER2. Sin embargo, los resultados en líneas celulares comerciales han dado resultados contradictorios sobre el resultado del efecto de PTP1B sobre todo en la vía de señalización de HER2. En ratones transgénicos que generan tumores HER2 positivos y deficientes en PTP1B, hay retraso en la aparición de tumores y metástasis pulmonares [54]. Estos datos indican que PTP1B tiene un papel importante en la regulación de la señalización de HER2, aunque aún no se conoce el mecanismo exacto y tampoco se conoce si tiene un papel similar con otros oncogenes y en otros tipos de tumores. Recientemente, en un estudio publicado en 2013, se analizaron 1,402 muestras de cáncer de mama en las que PTP1B se encuentra expresada en 49% de estas muestras, y se consideró como un factor pronóstico positivo para supervivencia global (Hazard ratio, HR=0.779) [55]. Estos hallazgos contrastan con otros estudios que señalan a PTP1B como promotor de tumores, por lo que se requiere investigación adicional que aclare esta ambigüedad del papel de PTP1B en el desarrollo de cáncer de mama. En cáncer gástrico, la sobreexpresión y amplificación de PTP1B se asocia a invasividad actuando como un oncogen, y el silenciamiento de PTP1B se asocia a disminución de N-cadherina y vimentina, y a un aumento de E-cadherina; aunque no se conoce la vía de señalización a través de la cual tiene efecto, se plantea que pudiera tener asociación con vías como la de las MAPK y P13K/Akt [56]. En nuestro laboratorio hemos encontrado que en cultivos primarios de cáncer de mama, la expresión de PTP1B se asocia con un fenotipo de mesénquima. Sin embargo, se desconoce cuál

es el papel de PTP1B en la transición epitelio-mesénquima de células tumorales mamarias, por lo cual, el objetivo del presente trabajo es estudiar este papel de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama. Encontramos que la estimulación con IL-6 induce la TEM a través STAT3 y que genera expresión de la PTP1B. Además, demostramos que al sobreexpresar PTP1B inducimos la TEM independientemente de la estimulación con IL-6. Por otra parte, el silenciamiento de PTP1B disminuye la expresión los marcadores mesenquimales lo que sugiere que en nuestro modelo de cultivos primarios de cáncer de mama, la PTP1B parece tener un papel como promotor de la TEM asociado a un estado metastásico más agresivo.

2 Definición del problema y justificación

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en México. La diseminación a sitios distantes es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en estas pacientes. Uno de los pasos cruciales dentro del proceso de metástasis es la TEM. Un mejor conocimiento de las vías que regulan la TEM permitirá una mejor comprensión de la resistencia a los distintos tratamientos, y probablemente el desarrollo de blancos terapéuticos para revertir la TEM que permitan detener la enfermedad metastásica.

Por otro lado, el papel de PTP1B en cáncer de mama no está del todo claro. En la TEM, la función de no ha sido explorado, aunque existen fundamentos para considerar que PTP1B tiene un papel biológico en este proceso. Algunos de los sustratos de esta fosfatasa son moléculas de la vía JAK2/STAT3 que están involucradas en la señalización de la IL-6, la cual induce la TEM. Además, resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran una correlación entre el fenotipo de mesénquima y la expresión de PTP1B.

3 Pregunta de investigación

¿Cuál es el papel de PTP1B en la transición epitelio-mesénquima inducida por IL-6 en cultivos primarios de cáncer de mama?

4 Hipótesis

La fosfatasa PTP1B es un promotor de la TEM en cultivos primarios de cáncer de mama por lo que esperamos que al sobreexpresar la PTP1B en células PTP1B negativas la TEM se induzca y por el contrario su silenciamiento revierta la TEM.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

- Determinar el papel de PTP1B en la transición epitelio-mesénquima inducida por IL-6 en cultivos primarios de cáncer de mama

5.2 Objetivos específicos

- Determinar los niveles de expresión de la fosfatasa PTP1B en células de cáncer de mama de cultivos primarios
- Inducir la TEM con IL-6 en células de cáncer de mama con fenotipo epitelial (PTP1B negativas: MBCDF, MBCD17, MBCD18), estimulando con diferentes dosis para lograr la TEM y mantenerla por 4 días. Se evaluará la expresión de E-cadherina, N-cadherina, vimentina y los factores de transcripción reguladores de la TEM Snail y Slug, así como pSTAT3-Y705/STAT3 por medio de Western blot.
- Analizar el efecto de la sobre-expresión de PTP1B sobre la inducción de la TEM con IL-6 en células de cáncer de mama con fenotipo epitelial (MBCDF, MBCD17, MBCD18). Durante la inducción de la TEM se transfectará el plásmido pcDNA4 que contiene el cDNA de PTP1B en su forma silvestre, se analizará los cambios en la expresión de E-cadherina, N-cadherina, Snail y Slug por medio de Western blot.
- Determinar el efecto del silenciamiento de PTP1B sobre el fenotipo de mesénquima en las células de cáncer PTP1B positivas. Se medirá la N-cadherina, vimentina, Snail y Slug, los cuales se analizarán mediante WB.

6 Materiales y métodos

6.1 Cultivos primarios de células de cáncer de mama

Se utilizaron los siguientes cultivos primarios de cáncer de mama MBCDF-B3 y MBCDF-D5 positivos y MBCD17, MBCDF y MBCD18 negativos para PTP1B, los cuales fueron previamente aislados y caracterizados en el laboratorio a partir de biopsias obtenidas de pacientes que fueron sometidas a mastectomía radical (Protocolo aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ref:1549 BOO-008-06/9-1) [57]. Las células se mantuvieron en RPMI-1640 (Gibco®, Invitrogen, Life Technologies, Carisbad, CA, USA) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Corning, Manassas, VN, USA), antibiótico y antimicótico e incubadas a 37 °C con atmósfera de 5 % CO₂.

6.2 Reactivos

Se utilizó IL-6, la cual fue obtenida de PeproTech (RockyHill, NJ. EUA). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios contra E-cadherina, N-Cadherina, vimentina, p-STAT3 (Tyr705) y STAT3 de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anti-Snail, anti-Slug y anti-N-cadherina de Cell Signalling Technology (Cambridge, MA, EUA). Los anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo-HRP se adquirieron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EUA).

6.3 Western Blot.

La extracción de la proteína se realizó raspando las células, se obtuvieron los pellets, los cuales fueron lisados con un buffer que contiene HEPES 50 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, Nonidato-P40 1%, NaF 10 mM, 1mM de vanadato de sodio e inhibidores de proteasas 1X (Complete, EDTA-free, Roche). La

proteína obtenida fue cuantificada mediante el método de Bradford. 25 µg de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) y fueron transferidos a una membrana de Immobilon-P PVPDF (Millipore Corp. Bedford, MA. EUA). Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en PBS-Tween 0.05%. Posteriormente fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos de primarios de interés: PTP1B, E-Cadherina, N-Cadherina, vimentina, Snail, Slug, pSTAT3, STAT3 y actina durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente las membranas se lavaron con PBS-Tween y se incubaron por 60 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP. La señal fue visualizada mediante quimioluminiscencia utilizando el kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y se reveló utilizando el fotodocumentador Chemidoc XRS+ con software Image Lab (Bio-Rad).

6.4 Transfecciones

Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 250,000 células por pozo. Las células positivas para PTP1B (MBCDF-D5, MBCDF-B3) se transfectaron con los siguientes plásmidos pGFP-V-RS sh control y 4 diferentes pGFP-V-RS shRNAs para PTP1B con las siguientes secuencias 5' ACGAGGACCATGCACTGAGTTACTGGAAG3', 5'TACCTCTGCTACAGGTTCTGTCAA3', 5'CCTTCTGTCTGGCTGATACCTGCCTCTTG 3', 5' GCGCTTCTCCTACCTGGCTGTCATCGAA 3' mediante el protocolo de Lipofectamina 3000 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una hora antes de la transfección se adicionó medio libre de SFB y antibióticos. Brevemente, la transfección se realizó diluyendo el DNA con medio y posteriormente adicionando el P3000 en un tubo eppendorf. Por otro lado se diluyó la lipofectamina 3000 en medio libre de suero. Ambos tubos se mezclaron y se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo el DNA con la lipofectamina se adicionó en las células y se incubó por 48 horas.

7 Resultados

7.1 Expresión basal de la fosfatasa PTP1B y marcadores de TEM en cultivos primarios de cáncer de mama

Para caracterizar la expresión de PTP1B y sus asociación con los marcadores de TEM, cinco cultivos primarios de cáncer de mama fueron analizados para la expresión de PTP1B, E-cadherina, vimentina, Snail y Slug por medio de Western blot (Figura 1). Los resultados mostraron que las células MBCDF, MBCD17 y MBCDF18 no presentaron expresión detectable de PTP1B por esta técnica, y las MBCDF-B3 y MBCDF-D5 presentaron niveles altos de PTP1B (Figura 1A). En estos cultivos se buscó la asociación de la expresión de PTP1B con los marcadores de TEM. Encontramos que las PTP1B negativas presentan características epiteliales ya que presentan expresión de E-cadherina y ausencia de vimentina, mientras que en las PTP1B positivas se observaron características mesenquimales con ausencia de E-cadherina y la presencia de vimentina (Figura 1A). Además, se determinó la expresión basal de los factores de transcripción reguladores de la TEM Snail y Slug, observando que las células PTP1B negativas tienen menor expresión de Snail y mayor cantidad de Slug en relación con las PTP1B positivas (Figura 1B). Tanto en la figura 1A y 1B, se muestran los niveles de actina como control de carga. Estos resultados demuestran que la expresión de PTP1B se asocia con un fenotipo de mesénquima.

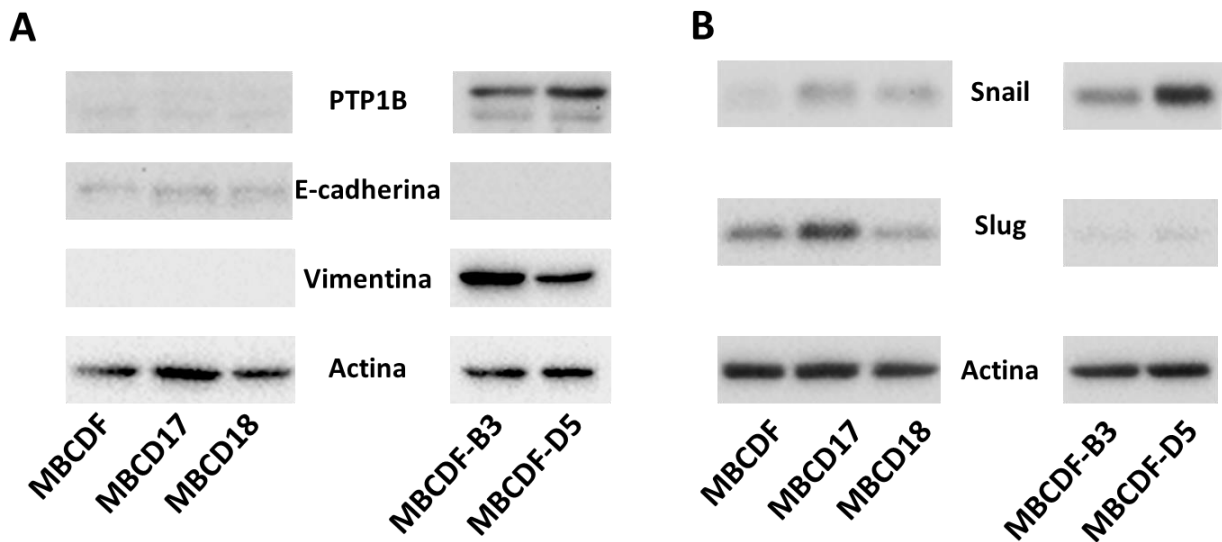


Figura 1. Expresión de marcadores de TEM en células PTP1B negativas y positivas. La expresión basal de PTP1B, así como de los diversos marcadores de TEM se realizó por Western blot utilizando anticuerpos específicos, en las cinco cultivos primarios de cáncer de mama utilizados (MBCDF, MBCD17, MBCD18, MBCDF-B3 y MBCDF-D5) **A.** Expresión de la fosfatasa PTP1B, E-cadherina y vimentina en cultivos primarios de cáncer de mama. **B.** Expresión basal de factores de transcripción Snail y Slug. La membrana se limpió y se determinaron los niveles de actina como control de carga.

7.2 Efecto de dosis crecientes de IL-6 sobre la TEM en cultivos primarios de cáncer de mama

Una vez que demostramos que en las células PTP1B negativas poseen un fenotipo epitelial y las PTP1B positivas presentan un fenotipo de mesénquima, nos preguntamos cual era el efecto de dosis crecientes de IL-6 sobre la TEM. Utilizamos las células MBCDF y MBCD18 con fenotipo epitelial y se adicionaron dosis de 0, 20, 40 y 80 ng/ml de IL-6 por 48 h. Se examinó la expresión de E-cadherina, vimentina, N-cadherina, Snail y Slug por medio de Western blot. Se observó la pérdida de expresión de E-cadherina y el aumento de la expresión de vimentina y N-cadherina de manera dosis respuesta (Figura 2A). Posteriormente, se analizó la expresión de los factores de transcripción Snail y Slug, observamos que Snail presenta aumento de su expresión con respecto a la dosis tanto en las MBCDF como en las MBCD18. En el caso de Slug, se observó un comportamiento diferente para cada cultivo primario, en las células MBCDF se observa un aumento de su expresión conforme aumenta la dosis de IL-6, y por el contrario, en las células MBCD18 se

observa un claro descenso conforme se incrementa la dosis de IL-6. Estos datos muestran que la IL-6 induce la disminución de E-cadherina y aumento de N-cadherina, vimentina y Snail de manera dosis respuesta. Por otra parte, Slug parece no tener una respuesta consistente con respecto al tratamiento con IL-6.

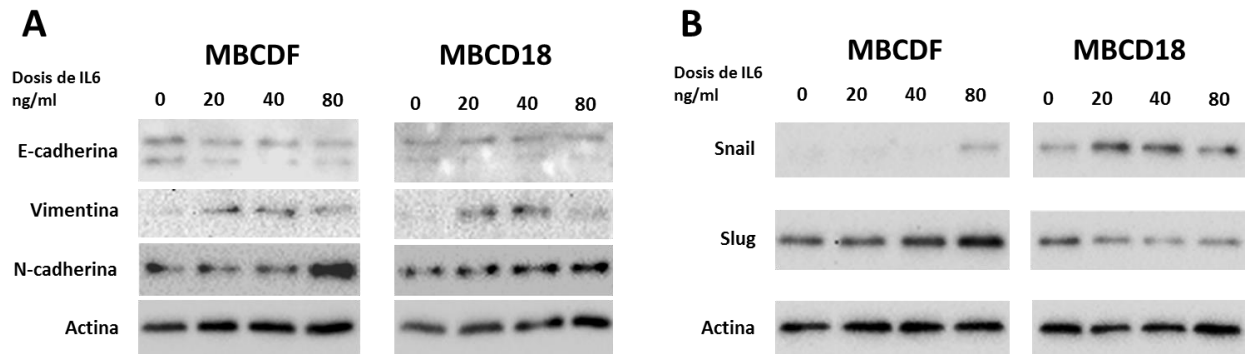


Figura 2. Efecto de dosis crecientes de IL-6 sobre la TEM en células PTP1B negativas. Las células de cáncer de mama MBCDF y MBCD18 se trataron con diferentes dosis de IL6 por 48 h. La expresión de E-cadherina, vimentina, N-cadherina, Snail y Slug se examinó por Western blot. **A.** Se muestra el efecto de la IL-6 sobre la TEM en células MBCDF y MBCD18, disminución de la expresión de E-cadherina y aumento de la expresión de vimentina y N-cadherina. **B.** La IL-6 induce efectos opuestos sobre los factores de transcripción Snail (aumento de expresión) y Slug (disminución de expresión). La actina fue utilizada como control de carga de la proteína total.

7.3 Efecto de un curso temporal de IL-6 por cuatro días induce la TEM a través de la fosforilación de STAT3 e induce la expresión de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama PTP1B negativos

Una vez que demostramos que la IL-6 induce la TEM mediante diversas dosis, investigamos si la TEM se mantiene durante un curso temporal largo de estimulación con IL-6. Se utilizaron las células MBCD18 y MBCD17 con fenotipo epitelial y se les adicionaron 20 ng/ml de IL-6 cada día y se colectaron las células los días 0, 1, 2, 3 y 4. Se observó la pérdida de expresión de E-cadherina y el aumento de la expresión de vimentina y N-cadherina con respecto al tiempo de tratamiento cuando comparamos con las células no tratadas (Figura 3A). También observamos un aumento de la expresión del factor de transcripción Snail y disminución de Slug respecto al tiempo de tratamiento en ambos cultivos primarios (Figura 3B). Por otra

parte, cuando analizamos el efecto de la IL-6 sobre la fosforilación de STAT3, observamos que esta se incrementa de forma creciente respecto al tiempo de tratamiento (Figura 3C). Finalmente, analizamos el efecto de IL-6 sobre la expresión de PTP1B en las células MBCD18. Encontramos que la fosfatasa PTP1B incrementó su expresión considerablemente al día 4 de tratamiento (Figura 3D). Todos estos resultados confirman que la inducción de la TEM mediada por la IL-6 en un curso temporal de 4 días existe un aumento de expresión de Snail, disminución de Slug y fosforilación de STAT3. Importantemente, al inducirse la TEM con la IL-6, hay un incremento en los niveles de PTP1B; estos datos concuerdan con los resultados encontrados en la figura 1, donde el fenotipo de mesénquima se asocia con la expresión de PTP1B.

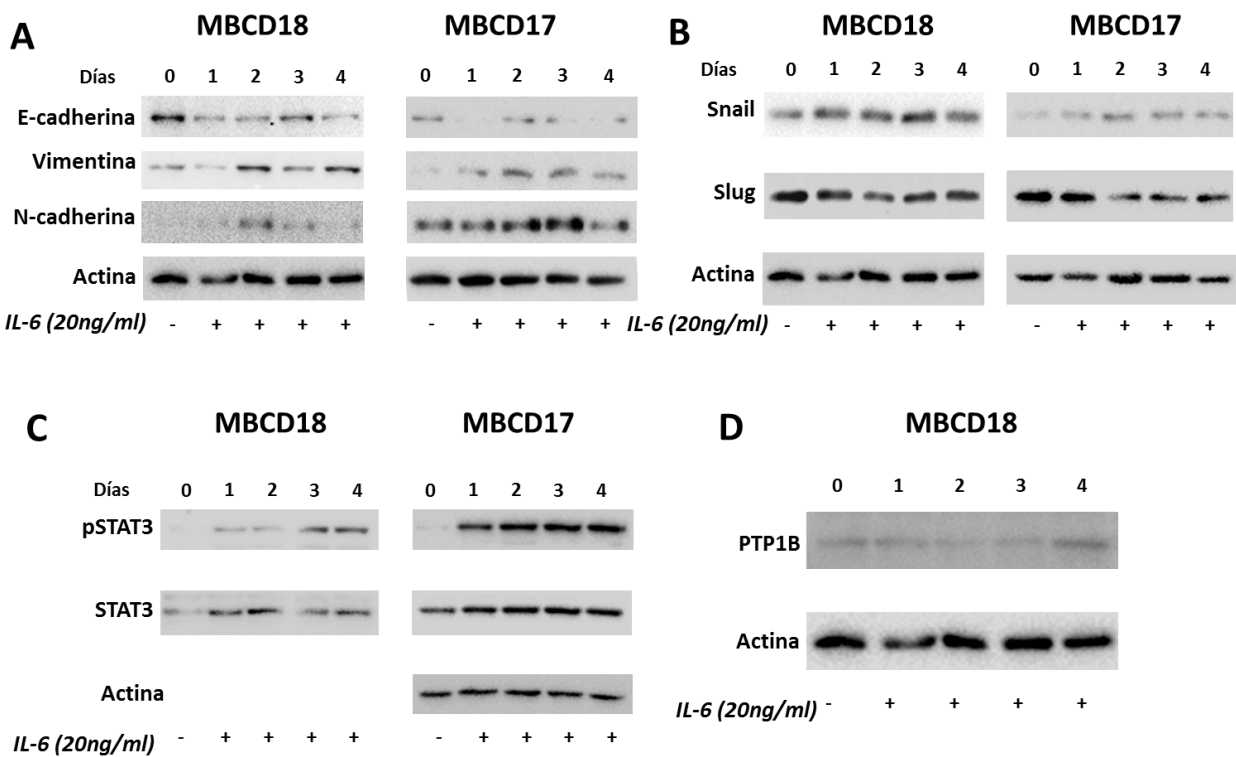


Figura 3. La estimulación continua con IL-6 induce la TEM a través de la fosforilación de STAT3 e incrementa la expresión de PTP1B en células epiteliales de cáncer de mama. Las células de cáncer de mama MBCD18 y MBCD17 se trataron 20ng/ml de IL-6 durante 4 días. Se analizó la expresión de E-cadherina, vimentina, N-cadherina, Snail, Slug, pSTAT3 y STAT3 mediante Western blot. **A.** La IL6 induce la pérdida de expresión de E-cadherina, aumento de vimentina y N-cadherina en relación a las células no tratadas por 4 días. **B.** Se observa aumento de la expresión del factor de transcripción Snail y disminución de Slug con la estimulación continua con IL-6. **C.** STAT3 incrementa su fosforilación en la Y705 con el tratamiento continuo con IL-6 en las células MBCD18 y MBCD17. **D.** La IL-6 induce la expresión de la fosfatasa PTP1B al día 4 de estimulación. La actina fue utilizada como control de carga de la proteína total.

7.4 La sobreexpresión de la fosfatasa PTP1B induce la TEM en cultivos primarios de cáncer de mama

PTP1B negativas de manera independiente a la estimulación con IL-6

Una vez corroborada la capacidad de la IL-6 de inducir la TEM sobre las células PTP1B negativas y sus efectos en STAT3, y los factores de transcripción Snail y Slug, se estudió el efecto de sobreexpresar PTP1B en las células MBCDF. Inicialmente, las células se estimularon con IL-6 por un día, después de este tiempo se transfectaron células tratadas y no tratadas con el plásmido pc-DNA4 vacío y el que contiene el cDNA para PTP1B en su forma silvestre, las células se colectaron 48 h post-transfección. Se analizó la expresión de PTP1B, E-cadherina, N-cadherina, Snail y Slug mediante Western blot. Los resultados mostraron que en las células transfectadas con el vector vacío no se observó la expresión de PTP1B tratadas o no con IL-6. En las células transfectadas con el cDNA de PTP1B silvestre se observa la sobre-expresión de PTP1B tanto en las células tratadas o no con IL-6. Posteriormente se examinaron los marcadores de TEM, se observó que en ambas situaciones el efecto de la IL-6 generó la esperada disminución de E-cadherina y aumento de N-cadherina; interesantemente, la sola transfección de PTP1B disminuyó la expresión de E-cadherina y sin cambio significativo de la N-cadherina con respecto al control transfectado con el vector vacío y sin IL-6. Al estimular con IL-6 las células transfectadas PTP1B hubo una mayor represión de la expresión de E-cadherina y mayor aumento de la N-cadherina con respecto a las demás condiciones (Figura 4A). Por otro lado, el factor de transcripción Snail sube sus niveles con el tratamiento con IL-6, como ya lo habíamos

demostrado antes. La sobre-expresión de PTP1B incrementa los niveles de Snail con respecto al control; mientras que la adición de IL-6 a una condición de sobre-expresión de PTP1B incrementa a Snail ligeramente más que a la transfección del vector vacío tratado con IL-6. Por otra parte, el factor de transcripción Slug disminuyó ligeramente con con el tratamiento con IL-6; sin embargo, no hay cambios significativos con la sobre-expresión de PTP1B y la estimulación con IL-6. Estos resultados demuestran que la sobre-expresión de PTP1B es capaz de promover la TEM de manera independiente a la estimulación con IL-6.

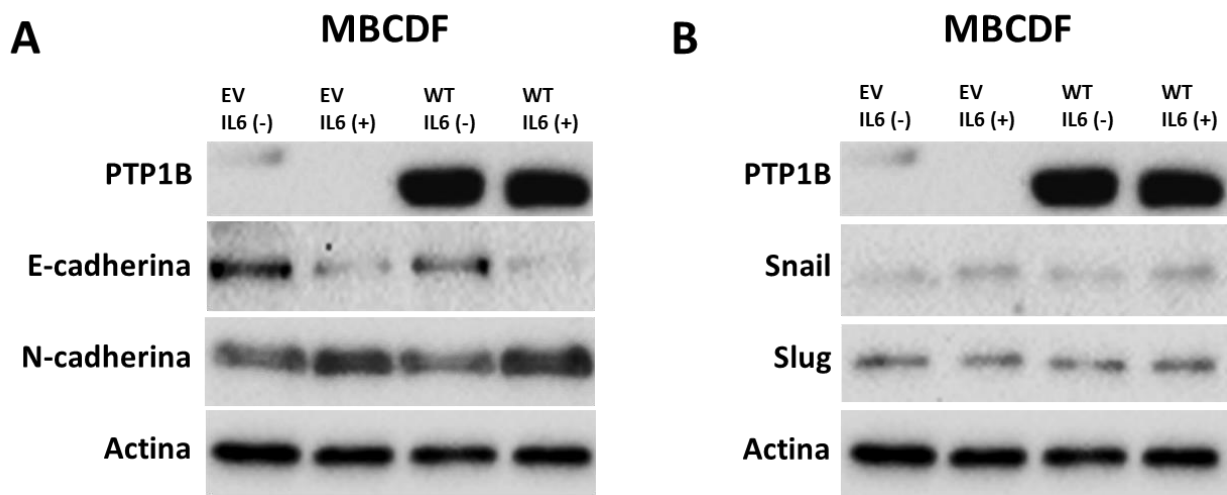


Figura 4. La sobreexpresión de la fosfatasa PTP1B promueve la TEM Las células de cáncer de mama MBCDF se transfectaron con el plásmido pcDNA4 vacío y el que contiene el cDNA de PTP1B silvestre. En ambas transfecciones a una de las condiciones se les adicionaron 20 ng/ml de IL6 previo a la transfección y posterior a la transfección. Se realizó Western Blot para analizar la expresión de PTP1B, E-cadherina, N-cadherina, Snail y Slug. **A.** La sobreexpresión de la fosfatasa PTP1B en las células MBCDF indujo la TEM, este efecto se potenció con la estimulación con IL-6. **B.** La sobre-expresión de PTP1B incrementa los niveles de Snail con respecto al control; mientras que la adición de IL-6 a una condición de sobre-expresión de PTP1B incrementa a Snail ligeramente más que a la transfección del vector vacío tratado con IL-6. La actina fue utilizada como control de carga de la proteína total.

7.5 El silenciamiento de la PTP1B revierte las características mesenquimales de las células PTP1B positivas de los cultivos primarios de cáncer de mama.

Una vez que se demostró que la sobreexpresión de PTP1B induce la TEM en células PTP1B negativas, se investigó el efecto de silenciar PTP1B en los cultivos MBCDF-B3 y MBCDF-D5 sobre los marcadores de

mesénquima que expresan estas células. Se transfectaron los plásmidos pGFP-V-RS sh control o pGFP-V-RS shRNA PTP1B con 2.5 µg totales de DNA (Figura 5). Se evaluaron los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina mediante Western blot, encontrando que el silenciamiento de PTP1B se asocia a una disminución en los niveles de expresión de N-cadherina y de vimentina (Figura 5A). Al estudiar la expresión de los factores de transcripción Snail y Slug durante el silenciamiento de PTP1B no se encontraron cambios significativos en estos con respecto al sh control (Figura 5B). La actina fue utilizada como control de carga de la proteína total. Estos datos apoyan el papel de PTP1B para mantener un fenotipo de mesénquima en las células primarias de cáncer de mama.

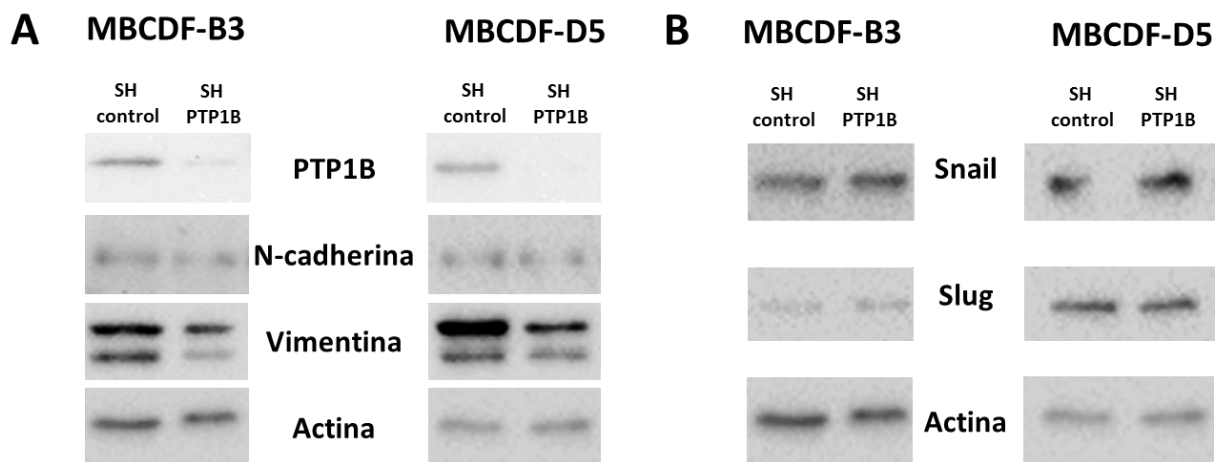


Figura 5. El silenciamiento de PTP1B revierte las características mesenquimales de las células PTP1B positivas. Se realizó la transfección de las células MBCDF-B3 y MBCDF-D5 con el plásmido pGFP-V-RS sh control y el plásmido pGFP-V-RS shRNA PTP1B. Se analizó la expresión de PTP1B, vimentina, N-cadherina, Snail y Slug por Western Blot. **A.** Las células de cáncer de mama MBCDF-B3 y MBCDF-D5 que se transfectaron con el shRNA de PTP1B disminuyeron los niveles de N-cadherina y vimentina en comparación con las transfectadas con el sh control. **B.** No se observan cambios en los factores de transcripción Snail y Slug durante el silenciamiento de PTP1B. La actina fue utilizada como control de carga de la proteína total.

8 Discusión y conclusiones

En los últimos años la asociación de la fosfatasa PTP1B con el cáncer ha sido ampliamente estudiada. En cáncer de mama el papel de PTP1B es controvertido. Por una parte, se ha descrito como un promotor tumores pero también hay reportes que sitúan a PTP1B como supresor de tumores. Un ejemplo de esto es un modelo murino transgénico en el que expresó una mutación en la región extracelular de HER2 (NDL2) que provocó desarrollo de tumores en la mama y metástasis en el pulmón, en este modelo la delección de PTP1B retrasó la aparición tanto de tumores como de metástasis pulmonares, sugiriendo un papel oncogénico de PTP1B [54]. Otros ejemplos con líneas celulares muestran que la sobreexpresión de PTP1B les confiere a las células mayor capacidad de migración e invasión [58]; sin embargo, esta información contrasta con la asociación de una mejor supervivencia global de pacientes que expresan la fosfatasa en sus muestras de tumor [55]. Para intentar clarificar el papel de PTP1B en cáncer de mama y el proceso de metástasis, en el presente trabajo investigamos si PTP1B participa en la TEM inducida por IL-6 en cultivos primarios de cáncer de mama. En primer lugar analizamos la expresión de PTP1B en cinco cultivos de cáncer de mama y su asociación con diversos marcadores de la TEM; encontramos que células de cáncer de mama con un fenotipo de mesénquima, identificados por la expresión de vimentina, expresan altos niveles de PTP1B. De manera contrastante, células de cáncer de mama con fenotipo de epitelio, identificado por la expresión de E-cadherina, no expresan PTP1B. Esto sugiere que PTP1B se encuentra expresada en células con un fenotipo metastásico y de mayor agresividad. Además, se analizó la expresión de los factores de transcripción Snail y Slug. Encontramos que las células PTP1B positivas presentan una mayor expresión de Snail comparado con las células PTP1B negativas. Por el contrario, la expresión de Slug fue apenas detectable en las células PTP1B positivas con respecto a las células PTP1B negativas. Estos resultados sugieren una regulación inversa entre Snail y Slug dependiendo del estado de TEM.

Posteriormente, corroboramos si en nuestro modelo de cultivos primarios de cáncer de mama, IL-6 era capaz de inducir la TEM, ya que esta descrito que la IL-6 es un potente inductor de este proceso. Este

fenómeno ya había sido demostrado en diversas líneas comerciales de cáncer de mama [41] [31]. La inducción de la TEM se realizó utilizando tanto una curva dosis respuesta como con un curso temporal de IL-6. La TEM se demostró mediante la represión de la E-cadherina y el aumento de la expresión de vimentina y N-cadherina, estos cambios estuvieron acompañados de la activación de STAT3 y el concomitante incremento de la expresión de Snail [59], este último tiene como función reprimir la expresión de E-cadherina [49, 50]. Sin embargo, Slug también conocido como un represor de E-cadherina [60]; en nuestro caso observamos una disminución de su expresión ante mayor dosis o tiempo de tratamiento con IL-6, lo que sugiere un comportamiento distinto ante el estímulo con IL-6 en nuestros cultivos primarios de cáncer de mama. Este fenómeno es similar al descrito por Ganesan et al [61] en el que Snail y Slug tienen funciones opuestas debido a las características intrínsecas de las células tumorales y a otras señales oncológicas no medidas. Interesantemente, observamos que la IL-6 induce la expresión de PTP1B de manera concomitante a la inducción de la TEM, sugiriendo que durante el proceso de TEM es indispensable la expresión de esta fosfatasa. Estos datos correlacionan con lo observado en la figura 1, donde las células de cáncer de mama en un estado de mesénquima presentan altos niveles de PTP1B. Cabe hacer notar que una de las funciones de PTP1B sobre la TEM podría ser la inactivación de vía de JAK2/STAT3, ya que JAK2 es un substrato bien reconocido de PTP1B [62]. Sin embargo, en nuestros resultados STAT3 permaneció fosforilado y la célula adquirió características mesenquimales, lo que sugiere que la acción de PTP1B no actúa sobre JAK2 para inhibir la activación de STAT3 y por lo tanto PTP1B tiene un papel independiente de la vía de JAK2/STAT3 en la promoción de la TEM.

Tomando en cuenta que PTP1B está asociada al fenotipo mesénquima y se induce su expresión durante la TEM mediada por IL-6, quisimos investigar más sobre el efecto de PTP1B en la TEM. Por lo que, sobre-expresamos y silenciamos PTP1B en los diferentes cultivos primarios de cáncer de mama dependiendo de la expresión de la fosfatasa. A las células PTP1B negativas (fenotipo epitelial) se les sobre-expresó la PTP1B

mientras se les inducía la TEM con IL-6. Observamos la represión de la E-cadherina y aumento de N-cadherina con el tratamiento con IL-6 como se esperaba. Cuando se sobre-expresó PTP1B, sin la estimulación de la IL-6, hubo una mayor disminución de la E-cadherina, siendo aún mayor la disminución de esta cuando las células estaban transfectadas con PTP1B y se estimuló con IL-6. La N-cadherina no mostró cambios significativos con la sola transfección de PTP1B, pero al adicionarle la IL-6 a la sobre-expresión de PTP1B hubo un mayor aumento de la N-cadherina comparado con el tratamiento solo de IL-6. No encontramos cambios significativos sobre los factores de transcripción Snail y Slug con la sobre-expresión de PTP1B. Por otro lado, el silenciamiento de PTP1B en las células con fenotipo de mesénquima mostró que la vimentina y la N-cadherina disminuyeron su expresión en relación al sh control. De manera similar a la sobre-expresión de PTP1B, el silenciamiento de esta no induce cambios significativos sobre los factores de transcripción Snail y Slug. Estos resultados sugieren que PTP1B juega un papel muy importante durante la TEM y que su sobre-expresión o silenciamiento modifican el estado de la TEM. Estos resultados concuerdan con lo observado por Wang et al, que silenciaron PTP1B en células de cáncer gástrico y observaron disminución de N-cadherina y vimentina, y en su caso aumento de E-cadherina [56].

Nuestros resultados muestran una asociación entre la expresión de PTP1B y el fenotipo de mesénquima en las células de cáncer de mama, indicando un posible papel de PTP1B en este proceso. Posteriormente, confirmamos que durante la inducción de la TEM con IL-6 se promueve la expresión de PTP1B, lo que apoya la participación de esta fosfatasa en la TEM. Interesantemente, encontramos una correlación inversa entre Snail y Slug durante la TEM inducida por IL-6. Finalmente, encontramos que la sobre-expresión de PTP1B induce la TEM y su silenciamiento la revierte confirmando que PTP1B tiene una función clave durante la TEM. Con nuestros resultados el desarrollo de inhibidores para PTP1B podrían tener un papel en la reversión de características mesenquimales de las células de cáncer de mama, evitando metástasis y haciéndolas más sensibles a tratamientos oncológicos.

10 Referencias

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(1): p. 7-30.
2. 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.
3. Dieci, M.V., et al., *Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities*. Oncologist, 2014. **19**(8): p. 805-13.
4. Arce-Salinas, C., et al., *[Evaluation of breast cancer treatment at a tertiary-level institution with Popular Health Insurance in Mexico]*. Rev Invest Clin, 2012. **64**(1): p. 9-16.
5. Klijn, J.G., E.M. Berns, and J.A. Foekens, *Prognostic factors and response to therapy in breast cancer*. Cancer Surv, 1993. **18**: p. 165-98.
6. Lowe, S.W., et al., *p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo*. Science, 1994. **266**(5186): p. 807-10.
7. Elledge, R.M., et al., *Accumulation of p53 protein as a possible predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, and prednisone for breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(16): p. 1254-6.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
9. 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.
10. 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.
11. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.

12. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
13. 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.
14. 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.
15. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 374-83.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Wang, S., et al., *Elevated expression of T-lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1 in squamous-cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance*. Eur J Cancer, 2014. **50**(2): p. 379-87.

22. Foroni, C., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact*. *Cancer Treat Rev*, 2012. **38**(6): p. 689-97.
23. Schaper, F. and S. Rose-John, *Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015. **26**(5): p. 475-87.
24. Wolf, J., S. Rose-John, and C. Garbers, *Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system*. *Cytokine*, 2014. **70**(1): p. 11-20.
25. Bachelot, T., et al., *Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(11): p. 1721-6.
26. Lippitz, B.E. and R.A. Harris, *Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(5): p. e1093722.
27. Kozłowski, L., et al., *Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients*. *Rocz Akad Med Białymst*, 2003. **48**: p. 82-4.
28. Conze, D., et al., *Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(24): p. 8851-8.
29. Arihiro, K., et al., *Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells*. *Breast Cancer*, 2000. **7**(3): p. 221-30.
30. Chiu, J.J., M.K. Sgagias, and K.H. Cowan, *Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines*. *Clin Cancer Res*, 1996. **2**(1): p. 215-21.
31. Asgeirsson, K.S., et al., *The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer*. *Cytokine*, 1998. **10**(9): p. 720-8.
32. 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.

33. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. *Biochem J*, 1998. **334 (Pt 2)**: p. 297-314.
34. Xiong, H., et al., *Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition*. *J Biol Chem*, 2012. **287(8)**: p. 5819-32.
35. 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.
36. You, L., et al., *The role of STAT3 in autophagy*. *Autophagy*, 2015. **11(5)**: p. 729-39.
37. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 as an oncogene*. *Cell*, 1999. **98(3)**: p. 295-303.
38. 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.
39. 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.
40. Wendt, M.K., et al., *STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas*. *JAKSTAT*, 2014. **3(1)**: p. e28975.
41. 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.
42. 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.
43. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15(3)**: p. 178-96.

44. Gong, C.X., et al., *Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target*. J Biomed Biotechnol, 2006. **2006**(3): p. 31825.
45. Tonks, N.K. and B.G. Neel, *Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 182-95.
46. Tonks, N.K., C.D. Diltz, and E.H. Fischer, *Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta*. J Biol Chem, 1988. **263**(14): p. 6722-30.
47. Tonks, N.K., *Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(11): p. 833-46.
48. Elchebly, M., et al., *Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1544-8.
49. Batlle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
50. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
51. Barr, A.J., *Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development*. Future Med Chem, 2010. **2**(10): p. 1563-76.
52. Myers, M.P., et al., *TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47771-4.
53. Labbe, D.P., et al., *PTP1B Deficiency Enables the Ability of a High-Fat Diet to Drive the Invasive Character of PTEN-Deficient Prostate Cancers*. Cancer Res, 2016. **76**(11): p. 3130-5.
54. Julien, S.G., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 338-46.
55. Soysal, S., et al., *PTP1B expression is an independent positive prognostic factor in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. **137**(2): p. 637-44.

56. Wang, N., et al., *Frequent amplification of PTP1B is associated with poor survival of gastric cancer patients*. Cell Cycle, 2015. **14**(5): p. 732-43.
57. Esparza-Lopez, J., et al., *Primary breast cancer cell culture yields intra-tumor heterogeneous subpopulations expressing exclusive patterns of receptor tyrosine kinases*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 740.
58. Liu, X., et al., *PTP1B promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating PTEN but not EMT*. Tumour Biol, 2016. **37**(10): p. 13479-13487.
59. Yuan, J., F. Zhang, and R. Niu, *Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17663.
60. Hajra, K.M., D.Y. Chen, and E.R. Fearon, *The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1613-8.
61. Ganesan, R., E. Malletts, and J. Gomez-Cambronero, *The transcription factors Slug (SNAI2) and Snail (SNAI1) regulate phospholipase D (PLD) promoter in opposite ways towards cancer cell invasion*. Mol Oncol, 2016. **10**(5): p. 663-76.
62. Lessard, L., M. Stuiblé, and M.L. Tremblay, *The two faces of PTP1B in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(3): p. 613-9.