



Facultad de Medicina



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE MEDICINA

**LA METFORMINA REVIERTE LA TRANSICIÓN EPITELIO-  
MESÉNQUIMA INDUCIDA POR IL-6 EN CÉLULAS DE  
CÁNCER DE MAMA**

**TESIS**

Como requisito para obtener el Grado de Especialista en:

**ONCOLOGÍA MÉDICA**

Presenta:

**DR. JUAN FRANCISCO ALVARADO MUÑOZ**

TUTOR DE TESIS

**DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA-SÁNCHEZ**

CO-TUTORES

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

Ciudad de México, 2021.

---

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 IL-6 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

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
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	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF, del inglés Insulin-like Growth Factor).
IL-6	Interleucina 6
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase).
MTF	Metformina.
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (del inglés, Platelet-Derived Growth factor).
RE	Receptores de Estrógenos.
RP	Receptores Progesterona.
STAT3	Transductor de señales y activador de transcripción 3 (del inglés, Signal Transducer and Activator of Transcription 3).
T3	Tumor mayor a 50 milímetros en su diámetro mayor.
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$ (del inglés Transforming Growth Factor $\beta$ ).
TEM	Transición epitelio-mesénquima.
TME	Transición mesénquima-epitelio.
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, (de inglés Vascular Endothelial Growth Factor).
WB	Western blot.

## **CONTENIDO**

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>HIPOTESIS .....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>35</b>

## **DEDICATORIA**

A mi familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y colegas.

A mis queridos tutores de tesis, la doctora Ibarra y el doctor Esparza, han sido maestros en muchos aspectos, gracias por su dedicación, paciencia y esmero esto fue posible, han sido ocho meses magníficos trabajando con ustedes, tienen un servidor en mi.

A todo el equipo del Departamento de Oncología Médica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en especial al doctor León, lo que he aprendido de ustedes y junto con ustedes jamás se los dejare de agradecer.

A la Dirección de Intercambio Académico de la Secretaria de Relaciones Exteriores de México, por apoyar económicamente mi entrenamiento.

Creo en Dios, y me enorgullece decir que todo esto esta su perfecta intervención.

## Resumen

**Antecedentes:** El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en México, la mayoría de las muertes se relaciona a la forma de presentación de la enfermedad como localmente avanzada o metastásica. La transición epitelio-mesénquima (TEM) es uno de los pasos indispensables para la metástasis. Diversos factores desencadenan la TEM, entre ellos destaca TGF- $\beta$ , EGF y la Interleucina-6 (IL-6) entre otros. La TEM se caracteriza por la pérdida de la expresión de E-cadherina y la expresión de N-cadherina y vimentina. La TEM ha sido recientemente estudiada a fin de interferir en el proceso de progresión y metástasis del cáncer. Reportes recientes postulan a la Metformina (MTF) con propiedades anti-tumorígenicas. En este estudio investigamos el efecto de la Metformina sobre la TEM inducida por IL-6 en células de cáncer de mama con fenotipo epitelial y en células de cáncer de mama que basalmente expresan un fenotipo mesenquimal. Además, se investigó si MTF tiene un papel inhibitorio en la proliferación, migración y la resistencia a doxorubicina mediadas por IL-6.

**Métodos:** Se utilizaron los cultivos primarios MBCD23, MBCD3, MBCDF-D5, MBCDF-B3, MBCDF, MBCD17 y MBCD25. Se midió la expresión de E-cadherina y vimentina mediante Western blot. Se realizaron ensayos de citotoxicidad con MTF, la viabilidad fue evaluada por la técnica de cristal violeta. Se estimularon las células con fenotipo epitelial con IL-6 para inducir la TEM, se midió la activación de STAT3 mediante anticuerpos fosfo-específicos. El efecto de la MTF se evaluó después de que las células habían sido inducidas a un fenotipo de mesénquima, se midió E-cadherina, vimentina y N-cadherina. Las células con fenotipo de mesénquima fueron tratadas con MTF por los siguientes tiempos: 0, 2, 4 y 6 días. Se realizó análisis por Western blot de la fosforilación de STAT3 y STAT3 total, así como expresión E-cadherina, vimentina y N-cadherina.

**Resultados:** Los cultivos primarios de cáncer de mama MBCD23, MBCD3, MBCDF-D5 y MBCDF-B3 expresan fenotipo de mesénquima, mientras que los cultivos primarios MBCDF, MBCD17 y MBCD25 expresan fenotipo epitelial. En ensayos de citotoxicidad, las células que presentan fenotipo de mesénquima son resistentes a la MTF con una  $IC_{50}$  que varía entre 36-60 mM, en comparación a una  $IC_{50}$  entre 6.5-23 mM para el fenotipo epitelial. La estimulación con IL-6 de los cultivos primarios MBCD17 y MBCDF de fenotipo epitelial, indujo la fosforilación de STAT3 sin alteración de sus niveles totales; además, de la pérdida de E-cadherina y aumento en la expresión de N-cadherina y vimentina. La posterior estimulación con MTF junto a IL-6 generó una reversión al fenotipo epitelial mostrando la

re-expresión de E-cadherina y disminución N-cadherina y vimentina. Por otro lado, en células con fenotipo de mesénquima MBCDF-D5 y MBCDF-B3 el tratamiento con MTF indujo la reducción de los niveles de vimentina, N-cadherina y de la fosforilación de STAT3 sin alteraciones de sus niveles totales, revirtiéndolas a un fenotipo epitelial. Finalmente, se demostró que MTF inhibe la proliferación, migración y resistencia a doxorubicina mediada por IL-6.

**Conclusiones:** Los resultados del presente trabajo sugieren que la MTF puede revertir la TEM mediada o no por IL-6 en cultivos primarios de cáncer de mama. Se presenta evidencia que apoya el uso potencial de la MTF en pacientes con cáncer de mama para prevenir y bloquear el potencial metastásico de células que se encuentren en TEM.

## Introducción

El cáncer de mama a nivel global representa el 25% de todas neoplasias malignas en mujeres, situándola como la más frecuente en este grupo. En México, representa desde el 2006 la primera causa de muerte por cáncer en mujeres [1, 2]. En 2012 se reportó un incremento en la incidencia de cáncer de mama, siendo del 2% en 1980 y reportándose para el año 2010 en 5% [2]. El sistema de vigilancia epidemiológica de México público en 2009 una incidencia a nivel nacional de 15 casos por 100,000 habitantes, notándose las mayores incidencias en el Distrito Federal (ahora Ciudad de México), Coahuila y Nuevo León, con 17, 18 y 14 casos por 100,000 habitantes respectivamente, y el estado con menor incidencia documentada fue Chiapas con 1.5 casos por 100,000 habitantes. De los datos anteriores hay que hacer notar que en México no existe un registro nacional de cáncer, por lo que lo reportado solo hace un estimado de la situación real del cáncer de mama en el País.

El estudio molecular del cáncer de mama ha permitido clasificar la enfermedad en diferentes subtipos, con el fin de traducir dicha información en terapias dirigidas y definir grupos pronósticos. En las últimas décadas dicha clasificación ha sufrido modificaciones que representan los avances en investigación y las adaptaciones para la global interpretación de los criterios de clasificación, eliminando un valor en específico del Ki67 y agregando parámetros clínicos y marcadores moleculares multiparamétricos, como principales modificaciones. De tal forma que ahora se reconoce como subtipos, a los luminales caracterizados por la expresión de receptores hormonales y la no expresión de HER2, estos se subdividen en el tipo luminal A, como aquellos tumores en los que el análisis de inmunohistoquímica evidencia una alta expresión del receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP), una determinación claramente baja del Ki67, y tumores clasificados por tamaño como T1 y T2 y una afección de 0 a 3 ganglios linfáticos, si se dispone de acceso a una determinación de marcadores moleculares multiparamétricos (Oncotype DX®, MammaPrint®) el resultado debe ser una valoración de riesgo favorable, este subtipo representa el 40% de los cánceres de mama y se relaciona con un pronóstico favorable. El subtipo luminal B lo caracteriza la baja expresión de receptores hormonales, un Ki67 claramente alto, la afección nodal mayor a tres ganglios, un grado histológico 3 (tumor poco diferenciado), invasión linfática vascular extensa y tumores voluminosos (T3), estos representan al 20% de los cánceres de mama y se relacionan con riesgo de muerte

de 1.96 (IC 95% 1.08-3.54). La sobre expresión de HER2 (25% de los tumores) o la ausencia de expresión de receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y HER2 se define como “Triple negativo” (15 a 20% de los cánceres de mama), ambos grupos considerados de mal pronóstico, con un riesgo de muerte de 7.39 (IC 95% 1.72-31.77) y 12.41 (IC 95% 5.82-26.49) respectivamente; cabe destacar que en las mujeres menores de 40 años con cáncer de mama los factores más influyen negativamente en la supervivencia global son la infiltración ganglionar o ser del subtipo molecular triple negativo [3, 4]. La introducción de agentes dirigidos a blancos moleculares específicos como el receptor de crecimiento epidérmico (Herceptin®, TDM-1, Pertuzumab®) han logrado respuestas objetivas en los tumores hasta de un 70% cuando son combinados con quimioterapia y han mejorado la supervivencia global. Esto solo es efectivo para un grupo seleccionado de pacientes; sin embargo, se ha visto que con el tiempo la enfermedad logra progresar y adquirir la capacidad de generar metástasis a otros sitios [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 baja sus niveles al mínimo, con un intercambio por N-cadherina. Existen otros marcadores que son regulados positivamente en la TEM como son: la 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) [13-16]. Otras moléculas de adhesión célula-célula como las claudinas 3, 4, 7,  $\alpha$ -catenina,  $\gamma$ -catenina, ocludinas son reguladas negativamente en células con fenotipo mesenquimatoso [14, 16]. La pérdida de E-cadherina es uno de los marcadores principales de la TEM y cabe hacer notar que el gen de *e-cadherina* no sufre deleciones o mutaciones, solo se han encontrado 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 [17]. 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 [18]. Dentro de las señales que activan la TEM se encuentran factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , 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) [19].

En los últimos años, se ha empezado a tomar en cuenta la influencia del microambiente tumoral en el desarrollo y comportamiento de los tumores. Se ha visto que existen citocinas y factores de crecimiento secretadas por las células que rodean al tumor como agentes cruciales en los procesos biológicos de proliferación, migración, invasividad y metástasis

de las células tumorales. Debido a esto se han explorado biomarcadores sistémicos y del microambiente tumoral, que están relacionados con la respuesta inmunológica innata y adquirida, los cuales han mostrado tener un papel crucial en la respuesta anti-tumoral [20]. El microambiente tumoral esta conformado por diversos tipos celulares, que incluyen a fibroblastos asociados al tumor, células neuroendocrinas, adipocitos, células inflamatorias del sistema inmune, células endoteliales y células de la cadena linfática [21]. Todas estas estirpes celulares contribuyen al desarrollo del tumor secretando factores de crecimiento, metaloproteinasas y citocinas que son necesarias para el desarrollo del tumor [22, 23].

Una de las citocinas que ha sido implicada en progresión tumoral es la interleucina-6 (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 [24, 25]. 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 VEGF [26, 27]. Se ha encontrado que los niveles circulantes de IL-6 en pacientes con cáncer de mama es 10 veces mayor que en mujeres sanas, existiendo una correlación entre mayores niveles de IL-6 con estadios más avanzados del cáncer de mama [26, 28]. 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 Doxorrubicina y la promoción de la motilidad celular requerida para la metástasis [29, 30]; 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 ADN en células con expresión del RE [31]. La IL-6 también ha sido implicada como un promotor de la TEM induciendo la represión de la expresión de E-cadherina [32].

La señalización de la IL-6 se da a través de la interacción con su receptor (IL-6R), y la glicoproteína de unión a membrana gp130, que se encuentra unida a JAK1,2 . 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, la cual es posteriormente activada mediante la fosforilación del residuo de tirosina 705 (Tyr705) [25, 33-35], induciendo así su dimerización. El dímero de STAT3 se transloca al núcleo, dando lugar a la transcripción de sus genes blanco. En la TEM mediada por IL-6, STAT3 induce la expresión de otros factores de transcripción como Snail, ZEB, Twist y Slug, que en común

generan la represión de la E-cadherina y transcripción de genes mesenquimales *n-cadherina*, *vimentina*, lo que genera la desintegración de las uniones celulares y pérdida de la polaridad epitelial [36]. Reportes recientes, destacan la importancia de 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, lo que propone a IL-6 como agente tumorigénico a través de la activación de la vía de JAK/STAT [12, 37]. Los efectos de la IL-6 en procesos biológicos de la célula tumoral como, proliferación, migración e invasividad, se han demostrado en células de cáncer de pulmón, mieloma múltiple y recientemente en células de carcinoma nasofaríngeo, donde se propone a la estimulación de la cascada de MAP cinasas dependientes de RAS como probables mecanismos de la proliferación tumoral dependiente de IL-6 [38]. Lo anterior sitúa a la TEM como indispensable para la generación de metástasis, observando a la vez que dicho proceso es reversible permitiéndole a la célula tumoral retomar un fenotipo epitelial una vez alcanzado el sitio de la metástasis [11].

Como se mencionó previamente, la TEM es una de los principales pasos para la metástasis, por lo cual, existe una intensa investigación tratando de encontrar estrategias dirigidas a interrumpir dicho proceso, y así poder dirigir nuevos tratamientos. Dentro de estas investigaciones, se destaca el estudio de la metformina (MTF) y su papel anti-tumoral. La MTF es una biguanida que es utilizada como droga hipoglucemiante oral y es la más prescrita para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Recientemente, la MTF ha recibido atención por sus potenciales efectos anti-tumorigénicos, en análisis retrospectivos de pacientes con cáncer de mama que recibieron neoadyuvancia, se han encontrado respuestas patológicas completas del 24% en las mujeres que recibieron MTF versus un 8% en las no recibieron MTF [39]. Por otra parte, análisis retrospectivos de pacientes diabéticos que recibieron tratamiento con MTF señalan una disminución del riesgo relativo de muerte de 0.43 (IC 95% 0.23-0.80) [40]. El mecanismo de acción es a través de inhibir la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, disminuyendo la actividad del Complejo I de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa de las células [41, 42]. Recientemente, se ha empezado a estudiar los efectos potenciales de la MTF en la reversión de la TEM. En células de adenocarcinoma de pulmón, se ha visto que la MTF revierte la disminución E-cadherina y el incremento Vimentina y Snail inducidos por

IL-6 [43]. Por otra parte en nuestro laboratorio, se encontró que el EGF induce TEM medida como la disminución de E-cadherina y aumento de la expresión de vimentina a través de la inducción del factor de transcripción Snail. Esta TEM es revertida por el tratamiento con MTF, en donde se observa re-expresión de E-cadherina y disminución de Vimentina y Snail (datos no publicados).

Dados estos antecedentes, en el presente trabajo analizamos el efecto de la MTF en la TEM inducida por IL-6. Se utilizó un modelo de cultivos primarios de cáncer de mama, los cuales fueron analizados para identificar su estatus en la TEM. A los cultivos con fenotipo epitelial se les indujo la TEM con IL-6, y se investigó el cambio de marcadores epiteliales (E-cadherina) por los mesenquimales (vimentina y N-cadherina); posteriormente, se adicionó la MTF y se analizó si esta era capaz de revertir la TEM inducida por IL-6. A los cultivos primarios que ya se encontraban en un fenotipo epitelial se estudió si la MTF era capaz de revertirlas a un fenotipo epitelial. Los resultados mostraron que la IL-6 induce TEM con la característica pérdida de E-cadherina y expresión de vimentina y N-cadherina. La adición de MTF revirtió este efecto de la IL-6 con re-expresión de E-cadherina y disminución de vimentina y N-cadherina. Interesantemente, en células de cáncer de mama con fenotipo de mesénquima, la MTF reduce la expresión de vimentina y N-cadherina, revirtiendo el fenotipo mesénquimatoso. Además, la MTF disminuye la proliferación y migración inducida por IL-6; también puede revertir la resistencia a doxorubicina.

## **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, a pesar de los avances en el tratamiento, la recurrencia y la formación de metástasis a distancia siguen siendo la principal causa de muerte por esta enfermedad.

La TEM es un proceso clave para la generación de metástasis y la IL-6 es uno de los principales inductores de esta, a través de la activación de la vía de JAK/STATs. La metformina ha demostrado tener actividad inhibitoria sobre la transición TEM inducida por el EGF y la IL-6, en esta última específicamente en células de cáncer de pulmón. Sin embargo, no se conocen los efectos que puede tener la metformina en la TEM inducida por IL-6 en células de cáncer de mama, así como en los procesos biológicos de proliferación, migración, y sensibilidad a fármacos citotóxicos.

## **JUSTIFICACIÓN**

En México, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, asociado a un incremento de la incidencia de la enfermedad.

Dado que la TEM es un paso crucial para el desarrollo de invasión y metástasis en el cáncer de mama, y esto representa la causa más frecuente de muerte en estas pacientes, es prioritario encontrar estrategias farmacológicas que permitan interferir con este proceso. La MTF ha demostrado revertir la TEM en células de cáncer de pulmón. Por lo tanto, es importante explorar el papel de la MTF en la TEM inducida por IL-6 en células de cáncer de mama y en procesos biológicos de proliferación y migración.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

En células epiteliales de cáncer de mama que han sido tratadas con IL-6 y han adquirido un fenotipo de mesénquima, ¿Puede la MTF revertir la TEM e inhibir procesos biológicos de proliferación, migración y revertir la resistencia a doxorubicina?

## **HIPÓTESIS**

Si la MTF es capaz de revertir la TEM inducida por la IL-6 en células de cáncer de mama, entonces será posible detectar la represión de marcadores mesenquimales como N-cadherina y vimentina, la re-expresión del marcador epitelial E-cadherina. Además, la MTF bloqueará la proliferación y migración inducida por IL-6, así como la resistencia a doxorubicina.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el efecto de la MTF en la TEM mediada por IL-6; así como, en los procesos biológicos de proliferación y migración, y la resistencia a doxorubicina en células de cáncer de mama.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Caracterizar la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimatosos en los cultivos primarios de cáncer de mama, MBCDF, MBCD17, MBCD25, MBCD3, MBCD23, MBCDF-D5, MBCDF-B3.
- Inducir la TEM con IL-6 en células de cáncer de mama que será evaluada por la pérdida de E-cadherina, y aumento en la expresión de vimentina y N-cadherina.
- Determinar el efecto de la metformina en los cultivos primarios de cáncer de mama.
- Determinar el efecto de la metformina sobre los marcadores de transición epitelio–mesénquima, E-cadherina, vimentina y N-cadherina, en células de cáncer de mama previamente tratadas con IL-6.
- Determinar el efecto de la metformina en la fosforilación de STAT3 en células previamente tratadas con IL-6.
- Determinar el efecto de la metformina en la fosforilación de STAT3 en células previamente tratadas con IL-6.
- Determinar los efectos de la MTF en los procesos de proliferación y migración en células de cáncer de mama previamente tratadas con IL-6.
- Determinar los efectos de la metformina en la sensibilidad a doxorubicina en células de cáncer de mama previamente tratadas con IL-6.

## **Materiales y Métodos**

### **Reactivos**

Anticuerpos primarios contra E-cadherina, Tubulina, pSTAT3 (Tyr705) y STAT3 fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Vimentina se obtuvo de Life Science Technologies (Grand Island, NY), N-cadherina se obtuvo de Cell Signalling Technology (Cambridge, MA). Los anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo-HRP se adquirieron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). La Interleucina-6 (IL-6) se obtuvo de PeproTech (Rocky Hill, NJ). La metformina fue adquirida de MP Biomedicals (Santa Ana, CA).

### **Cultivo Celular**

Los cultivos celulares primarios MBCDF, MBCD17, MBCD25, MBCD23, MBCD3, MBCDF-5 y MBCDF-B3 que se derivaron a partir de una biopsia del producto de una mastectomía realizada a una paciente con cáncer de mama (protocolo aprobado por el comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Ref. 1549, BQ0-008-06/9-1). Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Ensayos de Citotoxicidad**

Se sembraron 7,500 células/cm<sup>2</sup> en placas de 48 pozos por triplicado, se agregaron las concentraciones crecientes de MTF (0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 mM) y se incubó por 48 horas. La viabilidad celular se evaluó utilizando la técnica de cristal violeta. Al finalizar las 48 horas de incubación, se fijaron las células con glutaraldehído al 1.1% en PBS, dejando en agitación por 20 minutos, después las células fueron teñidas con cristal violeta, para posteriormente medir la densidad óptica mediante espectrofotometría a 570nm. El porcentaje de viabilidad fue calculado como la densidad óptica de los tratamientos con respecto al control no tratado.

## **Estimulación celular**

Se realizaron ensayos de estimulación con IL-6 para evaluar mediante Western blot la fosforilación de STAT3, usando un anticuerpo fosfo-específico en contra de pSTAT3 Y705. Se sembraron las células MBCDF y MBCD17 a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en platos de cultivo de 60 mm, mantenidas con medio RPMI-1640 suplementado con 0.1 % de suero fetal bovino. Las células se dejaron adherir toda la noche a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se estimuló con IL-6 a 1 ng/mL por los siguientes tiempos: 0, 5, 15, 30 y 60 minutos.

Para los ensayos de inducción y reversión de la TEM en células con fenotipo epitelial MBCD17 se diseñaron dos modelos experimentales, el primero se utilizaron tiempos cortos de inducción de TEM con IL-6 (0, 2, 4, 8, 12 y 24 h), posterior a estos tiempos con IL-6, se adicionó MTF por 3 h más a estos tiempos de IL-6. En el segundo ensayo, se la TEM en días (0, 1 y 2) , para lo cual se sembraron células a una densidad de 750,000 células por plato de cultivo de 60mm y se estimularon con IL-6 25 ng/ml, después de 24h se adicionó MTF 10 mM e IL-6 25 ng/ml dejando actuar por otras 24 h.

## **Ensayo de Inmunoblot (Western Blot)**

Las células estimuladas fueron lisadas con buffer de lisis que contiene: HEPES 50mM (pH 7.4), EDTA 1mM, NaCl 250mM, Nonidato P-40 1%, NaF 10mM, y 1X de inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free, Roche). 25 µg de proteína total se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante y fueron transferidos a una membrana de Immobilon-P PVDF (Millipore Corp. Bedford, MA), estas fueron bloqueadas durante 60 minutos en leche descremada al 5% en PBS-Tween al 0.05%. Posteriormente fueron incubadas con los respectivos anticuerpos primarios toda la noche a 4°C en agitación, Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón-HRP o anti-conejo-HRP según fuera el caso por 45 minutos. La señal fue visualizada mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Pico (Thermo, Rockford, IL) y finalmente se expuso a una película radiográfica Kodak.

## **Ensayos de Proliferación Celular**

Para la proliferación celular se sembraron 10,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pozos por triplicado. Se obtuvieron evaluaciones los días 0, 1, 3 y 5 días. En los días mencionados se

agregó MTT (5ng/mL) a cada pozo y se incubó por 2 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, posterior a lo cual fue aspirado el medio de cultivo del pozo. Luego de completarse los 5 días del experimento, se agregó a cada pozo 200 µL de isopropanol acidulado 0.1 N de HCl y 200 µL de PBS, dejando en agitación por 20 minutos. Posteriormente, se determinó la absorbancia mediante un lector de ELISA a una densidad óptica de 570 menos la de 630 nm. El incremento de la proliferación se realizó mediante la normalización de la densidad óptica obtenida del día correspondiente, con respecto a la densidad óptica del día cero. Se realizaron los experimentos por triplicado al menos tres veces de manera independiente reportando el promedio ± el error estándar.

### **Ensayos de Migración Celular**

La capacidad de migración de las células MBCDF, MBCD17 y MBCD25 se realizó mediante el ensayo de migración por cámara de Boyden y el ensayo de la Herida en la monocapa. Para el ensayo de migración por cámara de Boyden se sembraron 100,000 células/cm<sup>2</sup> por triplicado en placas de 24 pozos. Se sembraron de acuerdo a la siguientes cuatro condiciones: control, IL-6 5ng/mL, MTF 10 mM e IL-6 5ng/mL con MTF 10 mM. Las células se incubaron por 6 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se aspiró el medio de la cámara se limpio gentilmente la parte interna de la cámara con algodón, evitando deformar la membrana y/o contactar la parte externa. Se fijaron las células con glutaraldehído al 1.1% en PBS, durante 20 minutos en agitación, luego fueron teñidas con cristal violeta, dejando en agitación por 20 minutos, por último, se realizaron lavados con agua para retirar el exceso de colorante. Se procedió a contar las células que migraron mediante visualización con microscopio a un aumento de 20X, escogiendo 5 campos aleatorios de cada cámara de Boyden, el promedio del conteo de células de 5 campos fue dividido entre el área del campo visual (0.001 cm<sup>2</sup>), luego este cociente fue multiplicado por el área total de la membrana de la cámara de Boyden (0.33 cm<sup>2</sup>), obteniendo así el número de células que migraron a través de la membrana.

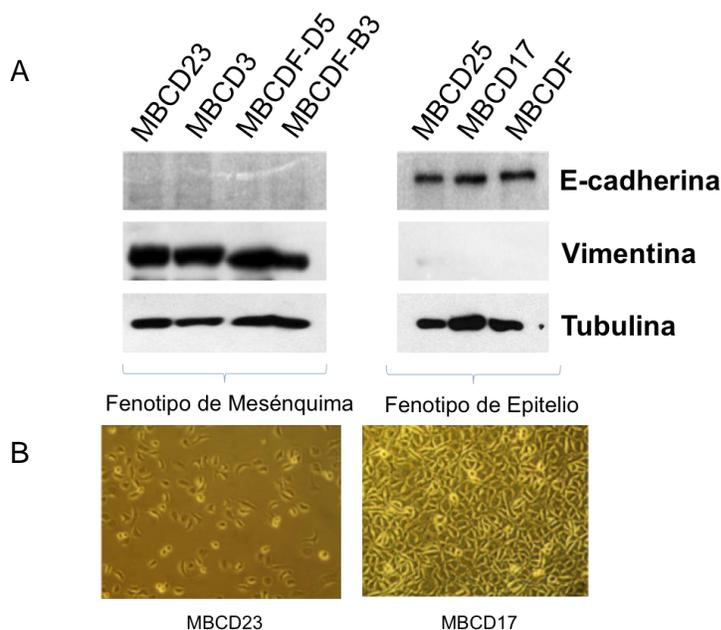
El ensayo de la Herida en monocapa se realizó sembrando las células MBCDF, MBCD17 y MBCD25 a una densidad de 250,000 células/pozo en una placa de 12 pozos, y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este periodo de tiempo se observó continuidad de la monocapa y se procedió a realizar tres heridas de forma continua sobre la misma con una punta de 200 µL. Se realizó un lavado para retirar las células que fueron

desprendidas de esta tras realizar la herida. Se evaluó la migración de las siguientes condiciones: control, IL-6 5 ng/mL, MTF 10 mM, e IL-6 5 ng/mL más MTF 10 mM. Las células se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se evaluó el cierre de la herida obteniendo fotografías del tiempo 0 (adición de IL-6 y MTF) y de las 24 horas para hacer análisis comparativo.

## Resultados

### Células de cultivos primarios de cáncer de mama, expresan fenotipo epitelial y mesénquimatoso

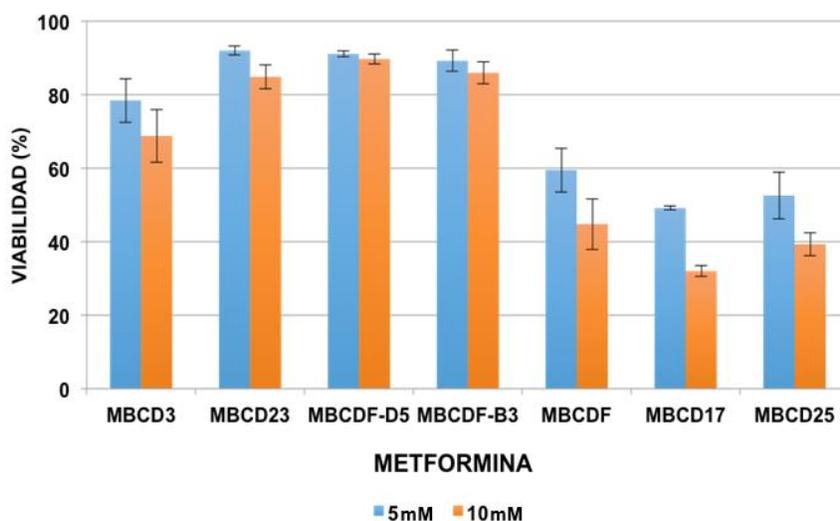
Se caracterizaron siete cultivos primarios en base a su apariencia morfológica y la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales. Se determinó la expresión de E-cadherina como marcador epitelial, y vimentina como marcador de mesénquima a través de la técnica de Western blot. Los resultados mostraron que los cultivos MBCD23, MBCD3, MBCDF-D5 y MBCDF-B3 expresan vimentina, pero no E-cadherina. Mientras que los cultivos MBCD25, MBCD17 y MBCDF presentan E-cadherina y ausencia de vimentina. Esta caracterización demuestra que se cuenta con cultivos que presentan fenotipo epitelial y otros que tienen un fenotipo mesenquimatoso (Figura 1a). La expresión de marcadores de TEM correlaciona con la morfología celular, las células epiteliales se caracterizan por ser pequeñas estrelladas y en contacto estrecho célula a célula, y las células en mesénquima presentan una morfología de células alargadas, creciendo de forma aislada (Figura 1b).



**Figura 1. Expresión de marcadores de TEM en diferentes cultivos primarios de cáncer de mama.** (A) Se analizó la expresión de E-cadherina y vimentina en los cultivos primarios de cáncer de mama MBCD23, MBCD3, MBCDF-D5 y MBCDF-B3 por Western Blot, el grupo con fenotipo de mesénquima muestran expresión de vimentina y ausencia de expresión de E-cadherina, contrario a lo observado en el grupo con Fenotipo Epitelial con expresión de E-cadherina y ausencia de expresión de vimentina. (B) Se presentan micrografías representativas del grupo con Fenotipo de Mesénquima del cultivo primario MBCD23 y del grupo con Fenotipo Epitelial MBCD17.

## Células de cáncer de mama con fenotipo de mesénquima son resistentes a la Metformina

Recientemente, la MTF ha surgido como un potencial fármaco antitumoral, asociándose a mejor pronóstico en pacientes con cáncer de mama [32,33,34]. Dado que el análisis de TEM en los diferentes cultivos primarios de cáncer mostró que algunos presentan fenotipo epitelial y otro fenotipo de mesénquima, analizamos su susceptibilidad a la MTF, para lo cual se realizaron ensayos de citotoxicidad con MTF a las dosis de 5 y 10 mmol/L en células con fenotipo epitelial MBCDF, MBCD17, MBCD25 y células con fenotipo de mesénquima MBCD3, MBCD23, MBCD5 y MBCD3. Los resultados mostraron que las células de cáncer de mama con fenotipo de mesénquima son resistentes a la MTF comparado con las células con fenotipo epitelial (Figura 2). Se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando un rango más amplio de concentraciones de MTF para calcular la IC<sub>50</sub>. Se encontró que las células MBCD3, MBCD23, MBCF-D5 y MBCD3 presentan una IC<sub>50</sub> que varían desde 23.97 mM hasta más de 52.61 mM; en contraste las células MBCDF, MBCD17, MBCD25 y MBCD4 tuvieron unas IC<sub>50</sub> pequeñas que van 5.31 mM hasta 11.45 mM (Tabla 1).



**Figura 2. La TEM induce resistencia a MTF en células de cáncer de mama.** Se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando MTF a dosis de 5 y 10 mmol/L en células con fenotipo de mesénquima (MBCD3, MBCD23, MBCDF-D5 y MBCDF-B3) y células con fenotipo epitelial (MBCDF, MBCD17, MBCD25), fueron sembradas 10 mil células en placas de 48 pozos y 24 horas después fueron tratadas con las dosis mencionadas de MTF por 48 horas. Se determinó la viabilidad mediante con técnica colorimétrica de cristal violeta. Se presentan los porcentajes de viabilidad celular observando diferencias entre las células que expresan fenotipo de mesénquima y aquellas que expresan fenotipo epitelial.

**Tabla 1. IC<sub>50</sub> de MTF en células de cáncer de mama.** Se realizaron ensayos de citotoxicidad con MTF a 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 mM por 48 h se reporta la IC<sub>50</sub>

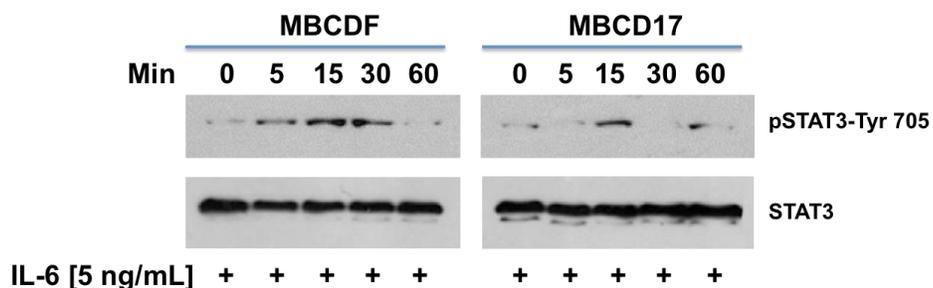
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA	IC <sub>50</sub>
MBCDF-D5	44.7±1.06
MBCD3	23.97±1.97
MBCD23	36.55±1.07
MBCDF-B3	52.61±1.08
MBCD25	10.11±1.20
MBCD17	5.31±1.10
MBCDF	11.45±1.13
MBCD4	8.17±1.14

La Tabla 1. es citada de: Esparza-López, José; Alvarado-Muñoz, Juan; Escobar-Arriaga, Elizabeth; Ulloa-Aguirre, Alfredo; Jesús Ibarra-Sánchez, María (2019): Figure 6: Metformin reverses mesenchymal phenotype of primary breast cancer cells through STAT3/NF-κB pathways. figshare. Journal contribution. <https://rdcu.be/caK67>; <http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>. No se realizaron cambios en esta tabla.

### **IL-6 induce la fosforilación de STAT3 en células de cáncer de mama**

Está bien establecido que la IL-6 señala a través de la activación de STAT3 [35]. Para demostrar que en los cultivos primarios de cáncer de mama que utilizamos, la IL-6 induce la activación de STAT3, estimulamos las células MBCDF y MBCD17 con 5 ng/mL de IL-6 por diferentes tiempos. La activación de STAT3 se midió como la fosforilación de la Tyr715 de STAT3 utilizando anticuerpos fosfo-específicos. Los resultados demuestran que la IL-6 induce la fosforilación de STAT3. La cinética de la fosforilación en pSTAT3-Tyr705 tuvo un pico de activación en las células MBCDF entre los 15 y 30 min, mientras que en las células

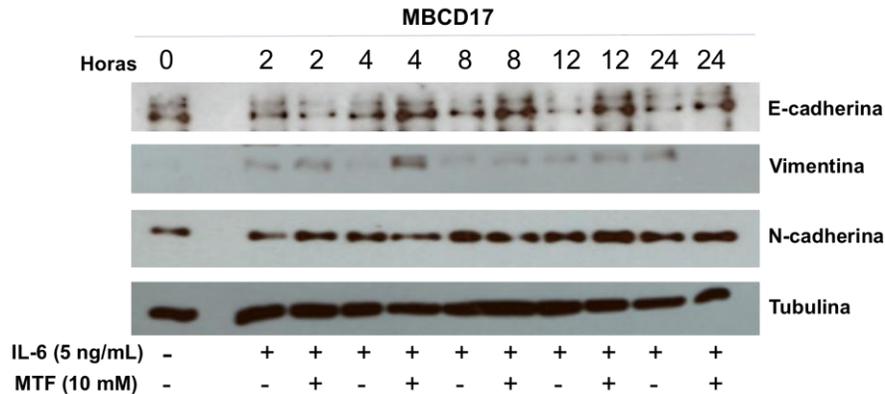
MBCD17 tienen un pico de activación del pSTAT3-Tyr705 a los 15 minutos (Figura 3). Estos resultados confirman que en estos cultivos la IL-6 señala a través de la activación de STAT3. [27].



**Figura 3. IL-6 Induce la fosforilación de STAT3 en células de cáncer de mama MBCDF y MBCD17.** Las células fueron tratadas con 5ng/ml de IL-6 a 0, 5, 15, 30 y 60 minutos, se realizó Western blot para analizar la fosforilación de STAT3 en la Tyr705, se utilizó como control el STAT3 total.

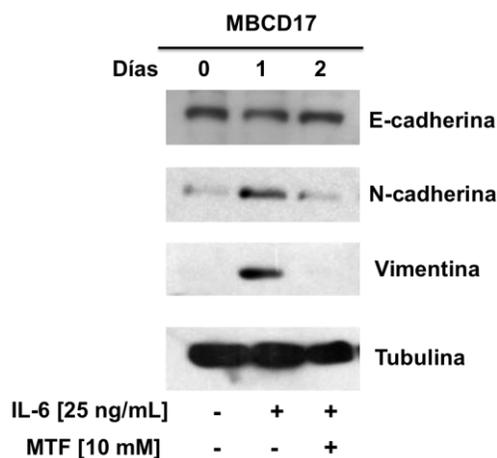
### La Metformina revierte la TEM inducida por IL-6 *in vitro* en células de cáncer de mama

En células de cáncer de pulmón se ha reportado que la MTF revierte la TEM inducida por IL-6 a través de STAT3 [43]. Para demostrar este efecto en los cultivos de cáncer de mama con fenotipo epitelial la IL-6 puede inducir TEM y que esta es revertida por MTF, analizamos si estimulación con IL-6 induce la TEM en las células MBCD17. Se midió E-cadherina y vimentina mediante la técnica de Western blot (Figura 4). Las células fueron tratadas con 5 ng/mL de IL-6 durante diferentes periodos de tiempo a lo largo de 24 horas (0, 2, 4, 8, 12 y 24 h), posterior a estos tiempos a una condición se le adicionó MTF 10 mM por 3 h. Se encontró que IL-6 induce una ligera caída en la expresión de la E-cadherina a partir de las 2h, que se vuelve más pronunciada a partir de las 12h. La MTF revierte la caída en la E-cadherina a partir de las 4h. A pesar de que los cambios en la expresión de E-cadherina son claros, para el caso de la vimentina y N-cadherina no son significativos, excepto para la vimentina a las 24 h. Estos resultados sugieren que la IL-6 induce cambios rápidos en la expresión de E-cadherina y es revertido por la MTF. Sin embargo, cambios para los marcadores de mesénquima requieren más tiempo (Figura 4).



**Figura 4. Metformina revierte la TEM inducida por IL-6 *in vitro* en células de cáncer de mama.** Las células de cáncer de mama MBCD17 fueron estimuladas con 5 ng/mL de IL-6 a los tiempos 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h. Después de estos tiempos a una condición se le adicionó MTF 10 mM por 3 h. Se evaluó la expresión de E-cadherina, vimentina y N-cadherina mediante la técnica de WB. La Tubulina fue utilizada como control de carga.

Basados en los resultados observados a los 24h de estimulación de IL-6 y pulso corto de MTF, se analizó si una estimulación por más tiempo y una mayor dosis de IL-6 (25 ng/mL) tenía un efecto más potente en inducir la TEM. Se estimuló con la IL-6 por un día y se adicionó a una condición la MTF 10 mM y se incubó por otras 24 h. Los resultados mostraron que al día 1 había una disminución de la E-cadherina con incremento en la expresión de vimentina y N-cadherina. Al día 2, con el tratamiento con MTF se observó que la E-cadherina se re-expresa con concomitante disminución de vimentina y N-cadherina (Figura 5).

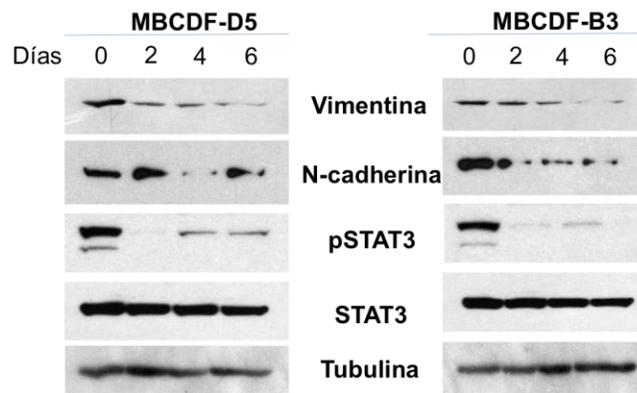


**Figura 5. La Metformina revierte la TEM inducida por IL-6 *in vitro* en células de cáncer de mama con fenotipo epitelial.** Las células de cáncer de mama, MBCD17, fueron estimuladas con 25 ng/ml de IL-6 por 24 horas, después de este tiempo se adicionó MTF 10 mM a una condición y se incubó por otro día más. Los cambios en TEM fueron determinados por cambios en la expresión

E-cadherina, vimentina y N-cadherina por medio de Western blot. Tubulina fue utilizada como control de carga.

### **Células con Fenotipo de Mesénquima pueden hacer una Transición Mesénquima-Epitelio tras el tratamiento con Metformina**

Una vez demostrado que MTF revierte la TEM inducida por IL-6 en células de cáncer de mama con fenotipo epitelial, nos preguntamos si la MTF es capaz de realizar la inducir la reversión de marcadores de mesénquima en células con este fenotipo. Para lo cual, utilizamos los cultivos con fenotipo de mesénquima, MBCDF-D5 y MBCDF-B3, tratadas con MTF 10 mM por 0, 2, 4 y 6 días. Se analizó la expresión de vimentina y N-cadherina por medio de Western blot. La MTF indujo una disminución de la expresión de los marcadores de mesénquima con respecto al día 0 de tratamiento. Después de 4 días de tratamiento con MTF observamos que tanto la vimentina como la N-cadherina disminuyen de manera significativa. Estos resultado sugieren que la MTF induce transición mesénquima-epitelio (TME), aún sin haber sido inducida por un factor de crecimiento (Figura 6). Por otra parte, analizamos si la MTF tenía algún efecto sobre la fosforilación de STAT3. Por lo cual, las células MBCDF-D5 y MBCDF-B3 fueron tratadas a lo largo de 6 días con MTF 10 mM y se midió el grado de fosforilación de STAT3 en la Tyr705 por Western blot. El tratamiento con MTF indujo la disminución de pSTAT3-Tyr705 a partir del día 2. Estos datos sugieren que la MTF induce una disminución de la activación de STAT3 y que este podría se un posible mecanismo por el cual induce la TME.

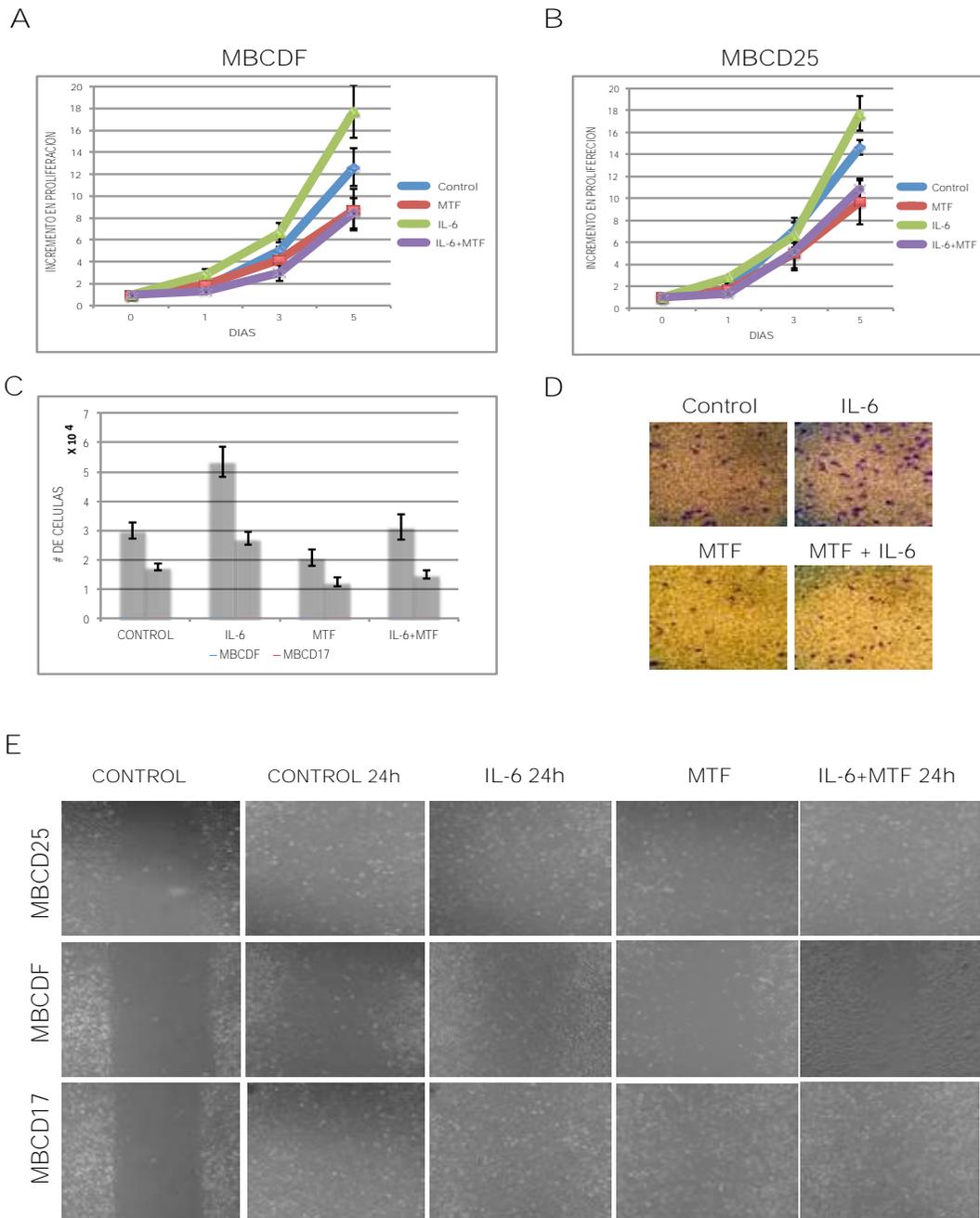


**Figura 6. Células con Fenotipo de Mesénquima pueden hacer una Transición Mesénquima-Epitelio mediante un tratamiento con Metformina.** Las células MBCDF-D5 y MBCDF-B3 fueron tratadas con MTF 10 mM por 0, 2, 4 y 6 días, se determino la expresión de Vimentina, N-cadherina, pSTAT3-Tyr705 y STAT3 por Western blot. La tubulina fue utilizado como control de carga.

## **La MTF inhibe la proliferación y migración inducida por IL-6 células de cáncer de mama**

Reportes previos de las funciones biológicas de IL-6 en células de carcinoma nasofaríngeo, postulan a esta citocina como un inductor de la proliferación y migración celular, esto al tratar las células con dosis crecientes de IL-6 [31]. Nosotros exploramos el papel de la IL-6 en la proliferación y migración de células de cáncer de mama con fenotipo epitelial MBCDF y MBCD25 y la reversión de estos procesos por MTF. Para los ensayos de proliferación se obtuvieron observaciones a los días 0, 1, 3 y 5, utilizando tres condiciones: células estimuladas con 5 ng/mL de IL-6, células tratadas con MTF 10 mM, y células tratadas con la combinación de IL-6 5 ng/ml y MTF 10 mM. Se observó un incremento de la proliferación de las células estimuladas con IL-6, este aumento en el nivel de proliferación fue inhibido por la MTF, llevando los niveles de proliferación a rangos similares e incluso inferiores al control (Figuras 7 A y B). Estos datos sugieren que la MTF revierte la proliferación inducida por IL-6.

Por otra parte, se evaluó si la IL-6 aumenta la migración de células de cáncer de mama y si este proceso puede ser inhibido por MTF. Para comprobar esto, se utilizaron células MBCDF y MBCD17 de fenotipo epitelial en dos tipos de experimentos; ensayos de migración en cámara de Boyden y ensayos de Herida en Monocapa. Los ensayos de migración en cámara de Boyden, mostraron un incremento en el número de células que migraron a través de la cámara de Boyden tras ser estimuladas con IL-6. Este efecto fue inhibido tras administrar MTF, tanto en las células MBCDF y MBCD17 (Figuras 7 C y D). Por otro lado, en el ensayo de la Herida en la Monocapa se evaluaron cuatro condiciones: 1) control a las 24 horas, 2) células tratadas con IL-6 a dosis de 5 ng/mL, 3) células tratadas con MTF a dosis de 10 mM, y 4) células tratadas con IL-6 mas MTF. Los resultados mostraron que la estimulación con IL-6 favorecen el cierre de la herida en comparación con las células control. El tratamiento con MTF induce una disminución en la migración lo que se traduce en un impedimento para cerrar la herida en la monocapa. Esta disminución en la migración se observa aun en las células tratadas con MTF en presencia de IL-6 (Figura 7 E). Estos datos sugieren que la MTF interfiere con el proceso de migración inducida por IL-6 en células de cáncer de mama.

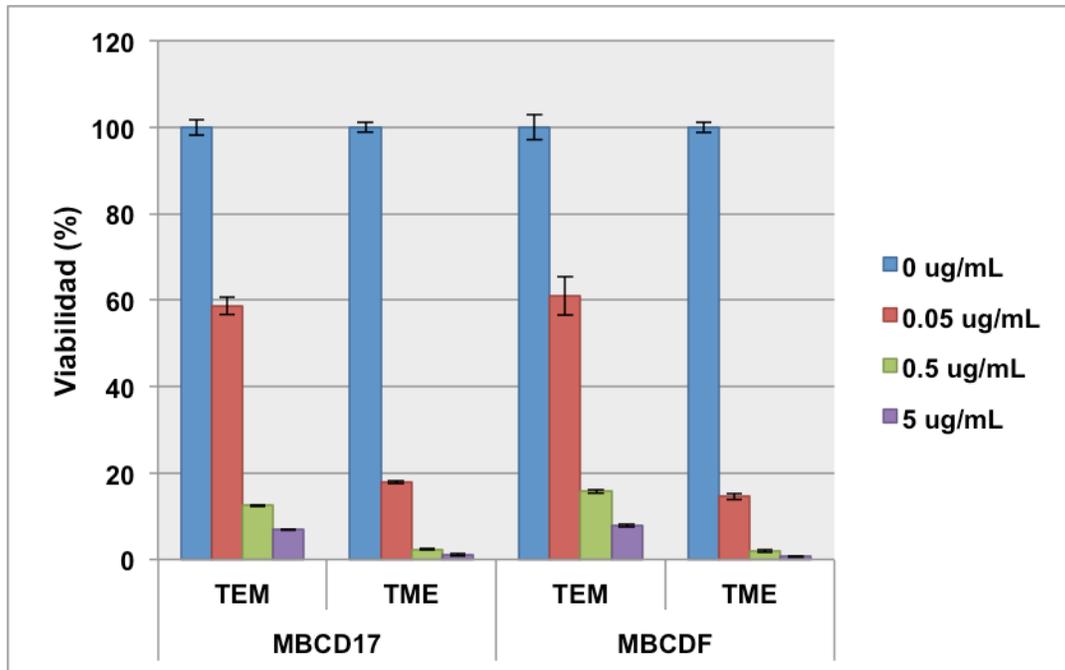


**Figura 7. La proliferación y migración inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama con fenotipo epitelial son inhibidas por MTF.** (A, B) El efecto de la IL-6 en la proliferación celular se evaluó estimulando con IL-6, con o sin MTF, por 1, 3 y 5 días, la proliferación fue determinada mediante ensayos con MTT. (C, D) Se evaluó la capacidad de IL-6 de promover migración celular incubando células con IL-6, con y sin MTF. La migración se midió en cámaras de Boyden cuantificando del número de células que migraron a la parte inferior de la cámara, se muestran fotografías representativas de las cuatro condiciones experimentales de las células MBCD17. (E) El efecto de IL-6 en la migración, (ensayo de Herida en Monocapa). Las células fueron sembradas a confluencia un día antes de realizar la herida sobre la monocapa. El cerrado de la herida se evaluó 24 hs después de realizada la herida. Se presentan fotografías representativas de las 4 condiciones experimentales (10X) a las 0 y 24 horas. Las figuras 7 (A) y (C) son citadas de: Esparza-López, José; Alvarado-Muñoz, Juan; Escobar-Arriaga, Elizabeth; Ulloa-Aguirre, Alfredo; Jesús Ibarra-Sánchez,

María (2019): Figure 6: Metformin reverses mesenchymal phenotype of primary breast cancer cells through STAT3/NF- $\kappa$ B pathways. figshare. Journal contribution. <https://rdcu.be/caK67>; <http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>. No se realizaron cambios en esta imagen.

### **MTF revierte la resistencia a Doxorubicina inducida por la TEM**

Existen reportes previos de que la MTF revierte la quimio-resistencia a múltiples drogas en líneas celulares de cáncer de mama vía activación de AMPK, observando una re-sensibilización a 5FU en las células MCF-7 y no así con doxorubicina y paclitaxel en células MDA-MB-231, ambas conocidas por ser resistentes a dichas drogas; en dicho estudio se administraron ambas drogas, quimioterapia y MTF de forma concomitante [44]. Por otra parte, en células de cáncer de vejiga urinaria, se ha observado relación entre la expresión del factor de transcripción Twist, que es reconocido como un marcador de TEM y la resistencia a doxorubicina, proponiendo como mecanismo de resistencia la sobre expresión de MDR, debido a que Twist tiene un sitio de unión al gen de MDR con la consecuente sobre expresión de dicha proteína [45]. Basados en estos antecedentes, y en el hecho que en nuestras células la MTF revierte la TEM inducida por IL-6, así como la proliferación y migración celular, se planteó la hipótesis que las células enviadas del fenotipo epitelial a mesénquima con IL-6 presentarían menor susceptibilidad a doxorubicina comparadas con aquellas células donde el fenotipo de mesénquima era revertido por la MTF. Para este objetivo, se prepararon células con fenotipo epitelial MBCD17 y MBCDF que solo se estimularon con IL-6 10 ng/mL por 24 horas, y por otra parte se prepararon otras células que se trataron con IL-6 10 ng/mL y posterior adición de MTF 10 mM. Se sembró un ensayo de citotoxicidad con doxorubicina a 0, 0.05, 0.5, y 5  $\mu$ g/mL por 48h. Los resultados mostraron que en las células donde se trató solo con IL-6 para inducir TEM, la doxorubicina induce una caída en la viabilidad de manera dosis respuesta. El tratamiento con la MTF a las células previamente tratadas con IL-6 mostró que hay un mayor caída en la viabilidad celular (Figura 8). Estos datos apoyan el hecho de que la MTF revierte la resistencia a doxorubicina a través de la reversión de la TEM.



**Figura 8. MTF revierte la resistencia a Doxorubicina inducida por la TEM** Se realizó ensayos de citotoxicidad utilizando doxorubicina a dosis de 0, 0.05, 0.5 y 5 µg/mL en células MBCDF, MBCD17, separadas por la expresión del fenotipo de TEM o TME como resultado del tratamiento previo con IL-6 y MTF. Se sembraron  $10 \times 10^4$  células en placas de 48 pozos, y 24 horas después fueron tratadas con las dosis mencionadas de doxorubicina por 48 horas. Se determinó la viabilidad mediante con técnica colorimétrica de cristal violeta. Se presentan los porcentajes de viabilidad celular.

## Discusión y Conclusiones

La TEM es uno de los pasos más críticos en el desarrollo de la metástasis, por ello la descripción de los mecanismos moleculares por los cuales se activa y como puede ser inhibida o revertida son de gran relevancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En el presente trabajo presentamos evidencia de que en células primarias de cáncer de mama, la MTF es un excelente candidato para revertir la TEM mediada o no por IL-6, revirtiendo los marcadores de mesénquima, así como procesos biológicos que incluyen a la proliferación y migración. Por otra parte, también demostramos que la MTF revierte la resistencia a la doxorubicina. Estos datos sugieren que la MTF es un excelente candidato para prevenir y bloquear el proceso de metástasis en cáncer de mama.

Una de las principales causas de mortalidad de los pacientes con cáncer de mama es la metástasis. En el proceso de la metástasis incluyen diversos pasos que una célula transformada tiene que pasar para migrar a un sitio distante. Entre los pasos cruciales de este proceso, se encuentra la TEM, que se caracteriza por la pérdida de la polaridad de la célula y la adquisición de propiedades invasivas [10, 12]. Para poder estudiar las propiedades metastásicas de una célula desarrollamos un modelo *in vitro* de TEM basado en cultivos primarios de cáncer de mama. El primer paso consistió en la caracterización de los cultivos para identificar cuáles presentaban marcadores epiteliales. Interesantemente, de este análisis encontramos varias de estas células presentaban marcadores de mesénquima, lo que implica que estas células ya realizaron la TEM.

En los últimos años se han incrementado los estudios enfocados a interferir con la TEM, en un intento de bloquear la metástasis. Uno de los fármacos que más atención ha recibido es la MTF, que es un medicamento ampliamente utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II [44]. Recientemente, se ha sugerido que la MTF tiene propiedades anti-tumorigénicas y que pacientes con diabetes que son tratados con MTF tienen un menor riesgo de desarrollar cáncer [40]. Nosotros investigamos el efecto de la MTF sobre la viabilidad de los cultivos primarios de cáncer de mama. En ensayos de citotoxicidad, utilizando diferentes concentraciones de MTF, las células de cáncer de mama que muestran marcadores de mesénquima mostraron resistencia a la MTF, mientras que las células con marcadores epiteliales fueron más sensibles. Estos resultados sugieren que las células que

ha iniciado una TEM sufren un cambio en su metabolismo que las hace resistentes a la MTF. Los mecanismos moleculares asociados a esta resistencia no se encuentran descritos por el momento.

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 [18]. Dentro de las señales que activan la TEM se encuentran factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , 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) [19]. La IL-6 es una citocina inflamatoria que ha sido asociada a la TEM [32, 45]. En nuestro modelo de cultivos primarios de cáncer de mama, estimulamos con IL-6 a células con marcadores epiteliales (MBCDF y MBCD17) tratando de inducir TEM, demostramos que IL-6 induce disminución de la expresión de E-cadherina en horas; sin embargo, para la aparición de los marcadores de mesénquima se necesitan días para que la IL-6 induzca una completa transformación del fenotipo epitelial a través de la vía de STAT3. Estos resultados demuestran que nuestro modelo *in vitro* de cultivos primarios de cáncer de mama, el tratamiento con IL-6 es capaz de inducir una TEM, como lo demuestra la expresión de los marcadores vimentina y N-cadherina, característicos de una fenotipo mesenquimal.

Existen varios reportes que muestran que la MTF puede revertir la TEM inducida por IL-6 a través de la señalización de STAT3 en cáncer de pulmón [43, 46]. En nuestro modelo de cultivos primarios de cáncer de mama las células fueron tratadas con IL-6 durante diferentes períodos de tiempo a lo largo de 24 horas, los resultados mostraron que el tratamiento con IL-6 induce una ligera caída de la E-cadherina a partir de las 2 h de tratamiento. La adición de MTF parece revertir esta caída a partir de las 4 h; sin embargo, a pesar de los cambios en E-cadherina, la vimentina y la N-cadherina no mostraron cambios significativos. Un panorama distinto se observa con una estimulación con IL-6 a mayor tiempo y dosis. Los resultados mostraron que al día uno había una franca disminución de E-cadherina, con un

incremento de la vimentina y N-cadherina. El tratamiento con MTF mostró al día 2 una re-expresión de la E-cadherina junto con una disminución de la expresión de vimentina y N-cadherina. Estos resultados demuestran que los procesos de TEM y TME requieren de cambios transcripcionales drásticos en los que la célula cambia enteramente su comportamiento.

Por otro lado, en este estudio analizamos la capacidad de la MTF de revertir tanto la TEM tanto en células estimuladas con IL-6 como en células que expresan un fenotipo mesenquimal. La re-expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina como la reversión de marcadores mesenquimatosos como vimentina y N-cadherina, además de la disminución en la fosforilación de STAT3 confirman este hecho. En nuestro conocimiento, este trabajo es pionera en demostrar que la MTF puede revertir un estado mesenquimatoso en cultivos primarios de cáncer de mama. En la literatura existen otros reportes donde analizan la capacidad de la MTF de interferir con la TEM en líneas comerciales de cáncer de mama. La mayoría de estos estudios están enfocados al revertir la resistencia a fármacos que se genera al momento de pasar a un fenotipo mesenquimal. Sin embargo, algunas de las líneas que se utilizan como la MCF-7 son resistentes al tratamiento con MTF.

El papel de IL-6 en los procesos de migración e invasividad se ha explorado en células de carcinoma de nasofaringe, demostrando que el bloqueo del IL-6R mediante un anticuerpo monoclonal revierte dichos procesos, incluido el fenotipo de TEM [47]; de la misma forma se ha estudiado el papel de la MTF en la inhibición de los procesos biológicos de proliferación y migración en líneas celulares de carcinoma de tiroides, próstata, páncreas y fibrosarcoma [48-50]. Dados los resultados obtenidos anteriormente, abordamos la pregunta de cuales eran los efectos de la MTF en procesos biológicos como la proliferación y la migración de los cultivos de cáncer de mama con fenotipo epitelial y que eran inducidos a un fenotipo de mesénquima con IL-6. De manera consistente con lo ya antes mencionado, la MTF inhibió la proliferación y migración de las células de cáncer de mama. Esto muy probablemente se deba a la disminución de la activación de las vías de señalización inducidas por IL-6, como STAT3, y también a la baja en el metabolismo celular inducido por la MTF.

La MTF se ha asociado con la reversión de quimio-resistencia a múltiples drogas en líneas celulares de cáncer de mama vía activación de AMPK, observando una re-sensibilización a 5FU[51]. En células de cáncer de vejiga, también se ha observado una relación entre la expresión del factor de transcripción Twist y la resistencia a doxorubicina, en el cual se propone una inducción de la expresión de MDR [45]. En nuestro estudio, analizamos si el fenotipo de TEM inducido por IL-6 y la TME inducida por MTF mostraban diferencias en la susceptibilidad al efecto citotóxico de doxorubicina. Las células que estaban inducidas a TME por MTF mostraron mayor susceptibilidad a la doxorubicina comparada con las células que estaban en TEM. Estos resultados demuestran que la MTF también participa en la sensibilización a la doxorubicina como ya se ha demostrado en estudios antes mencionados[51].

En resumen, nuestro trabajo sitúa a la MTF como un supresor del la TEM, ya que puede revertir esta tanto cuando es inducida por IL-6, o cuando las células se encuentran en estado mesenquimal. Las implicaciones de esto son muy variadas, por un lado podemos interferir con el potencian metastásico de las células al revertirlas a un fenotipo menos agresivo. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios presentes en la literatura demostraron que la MTF puede interferir con el potencial metastásico de líneas comerciales de cáncer de mama [52]. Por otro lado, ya que varios reportes han asociado la resistencia a fármacos con la TEM [53], resulta un abordaje muy atractivo el poder interferir con esta, pudiendo establecer nuevas estrategias de tratamiento para el tratamiento del cáncer de mama localizado o del cáncer de mama metastásico.

## 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. Forouzanfar, M.H., et al., *Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis*. Lancet, 2011. **378**(9801): p. 1461-84.
3. Coates, A.S., et al., *Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1533-46.
4. Haque, R., et al., *Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(10): p. 1848-55.
5. Hortobagyi, G.N., *Developments in chemotherapy of breast cancer*. Cancer, 2000. **88**(12 Suppl): p. 3073-9.
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. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.X. Fu, *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 1014-22.
21. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 309-22.
22. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
23. Whiteside, T.L., *The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth*. Oncogene, 2008. **27**(45): p. 5904-12.
24. Schaper, F. and S. Rose-John, *Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 475-87.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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*. Roczniki Akad Med Białymost, 2003. **48**: p. 82-4.
29. Conze, D., et al., *Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8851-8.
30. Arihiro, K., et al., *Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells*. Breast Cancer, 2000. **7**(3): p. 221-30.
31. 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.
32. 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.
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. 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.
35. 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.
36. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
37. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 as an oncogene*. Cell, 1999. **98**(3): p. 295-303.
38. Ogata, A., et al., *IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2212-21.
39. Jiralerspong, S., et al., *Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(20): p. 3297-302.
40. Kourelis, T.V. and R.D. Siegel, *Metformin and cancer: new applications for an old drug*. Med Oncol, 2012. **29**(2): p. 1314-27.
41. Griss, T., et al., *Metformin Antagonizes Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mitochondrial-Dependent Biosynthesis*. PLoS Biol, 2015. **13**(12): p. e1002309.
42. Andrzejewski, S., et al., *Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics*. Cancer Metab, 2014. **2**: p. 12.

43. 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.
44. Rizos, C.V. and M.S. Elisaf, *Metformin and cancer*. Eur J Pharmacol, 2013. **705**(1-3): p. 96-108.
45. Johnston, P.G., et al., *Identification of a protein factor secreted by 3T3-L1 preadipocytes inhibitory for the human MCF-7 breast cancer cell line*. Cancer Res, 1992. **52**(24): p. 6860-5.
46. Li, L., et al., *Metformin sensitizes EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells in vitro and in vivo through inhibition of IL-6 signaling and EMT reversal*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(10): p. 2714-26.
47. Sun, W., et al., *Interleukin-6 promotes the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell lines and upregulates the expression of MMP-2 and MMP-9*. Int J Oncol, 2014. **44**(5): p. 1551-60.
48. Kobawala, T.P., et al., *Significance of Interleukin-6 in Papillary Thyroid Carcinoma*. J Thyroid Res, 2016. **2016**: p. 6178921.
49. Lee, S.O., et al., *Interleukin-6 promotes androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 370-6.
50. Zhang, Y., et al., *Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance*. Cancer Res, 2013. **73**(20): p. 6359-74.
51. Qu, C., et al., *Metformin reverses multidrug resistance and epithelial-mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human breast cancer cells*. Mol Cell Biochem, 2014. **386**(1-2): p. 63-71.
52. Vazquez-Martin, A., et al., *The anti-diabetic drug metformin suppresses the metastasis-associated protein CD24 in MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells*. Oncol Rep, 2011. **25**(1): p. 135-40.
53. Liang, S.Q., et al., *Blocking the epithelial-to-mesenchymal transition pathway abrogates resistance to anti-folate chemotherapy in lung cancer*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1824.