

Título del artículo.

La leptina induce la secreción de metaloproteinasa 2 y el aumento en la expresión de vimentina en células MCF10A.

Título del artículo en idioma Inglés.

Leptin induces secretion of metalloproteinase 2 and increases expression of vimentin in MCF10A cells.

Autores.

José Alfredo Villanueva Duque
Misael Ramírez Estrada
Marisol Rodríguez Vázquez
Eduardo Castañeda Saucedo
Napoleón Navarro Tito

Referencia bibliográfica:

MLA

Villanueva Duque, José Alfredo, Misael Ramírez Estrada, Marisol Rodríguez Vázquez, Eduardo Castañeda Saucedo, Napoleón Navarro Tito. "La leptina induce la secreción de metaloproteinasa 2 y el aumento en la expresión de vimentina en células MCF10A". *Tlamati* 8.2 (2017): 12-16. Print.

APA

Villanueva Duque, J. A., Ramírez Estrada, M., Rodríguez Vázquez, M., Castañeda Saucedo, E. y Navarro Tito. N. (2017). La leptina induce la secreción de metaloproteinasa 2 y el aumento en la expresión de vimentina en células MCF10A. *Tlamati*, 8(2), 12-16.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Diciembre del 2017

© 2017 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



La leptina induce la secreción de metaloproteinasa 2 y el aumento en la expresión de vimentina en células MCF10A

José Alfredo Villanueva Duque¹
Misael Ramírez Estrada¹
Marisol Rodríguez Vázquez¹
Eduardo Castañeda Saucedo¹
Napoleón Navarro Tito^{1*}

¹Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas S/N CP. 39087 Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. México.

*Autor de correspondencia
navatito@hotmail.com

Resumen

Actualmente el cáncer de mama es considerado un problema de salud pública a nivel mundial. Diversos estudios epidemiológicos han asociado a la obesidad como un factor de riesgo muy importante con el inicio y progresión del cáncer de mama, esto debido al incremento en la producción de proteínas por parte de los adipocitos que promueven un incremento en la migración e invasión de células cancerosas como la leptina. El propósito del trabajo fue evaluar el efecto de la leptina sobre la migración celular, secreción de metaloproteinasas (MMPs) y la expresión de algunos marcadores mesenquimales como vimentina en células de epitelio de mama no tumoral. La migración celular se evaluó mediante ensayos por cierre de herida, la secreción de MMPs fue determinada por zimografía en gelatina y los niveles de vimentina se determinaron mediante Western blot. Nuestros resultados muestran que leptina induce migración celular en células MCF10A de una manera dependiente de la dosis. Aunado a esto se observó que leptina promueve la secreción de MMP-2, MMP-9 y el incremento en los niveles de expresión de vimentina. Por los anteriores resultados podemos concluir que la leptina induce la expresión y secreción de proteínas que participan de manera activa en eventos relacionados con la transición epitelio-mesenquimal en células MCF10A.

Palabras clave: Cáncer de mama, metaloproteinasas, vimentina, migración, leptina

Abstract

Currently, breast cancer is considered a worldwide public health problem. Several epidemiological studies have associated obesity as a very important risk factor with the onset and progression of breast cancer, due to the increase in protein production by adipocytes that promote an increase in cancerous cell migration and invasion like leptin. Objective of this study was to evaluate effect of leptin on cell migration, secretion of metalloproteinases (MMPs) and expression of some mesenchymal markers such as vimentin in non-tumoral breast epithelial cells. Cell migration was evaluated by wound closure assays, secretion of MMPs was determined by zymography in gelatin and vimentin levels were determined by Western Blot. Our results show that leptin induces cell migration in MCF10A cells in a dose-dependent manner. In addition to this, it was observed that leptin promotes secretion of MMP-2, MMP-9 and the in-

Como citar el artículo:

Villanueva Duque, J. A., Ramírez Estrada, M., Rodríguez Vázquez, M., Castañeda Saucedo, E. y Navarro Tito, N. (2017). La leptina induce la secreción de metaloproteinasa 2 y el aumento en la expresión de vimentina en células MCF10A. *Tlamati*, 8(2), 12-16.

crease in expression levels of vimentin. From the above results we can conclude that leptin induces expression and secretion of proteins that participate actively in events related to the epithelial-mesenchymal transition in MCF10A cells.

Keywords: Breast cancer, metalloproteinases, vimentin, migration, leptin

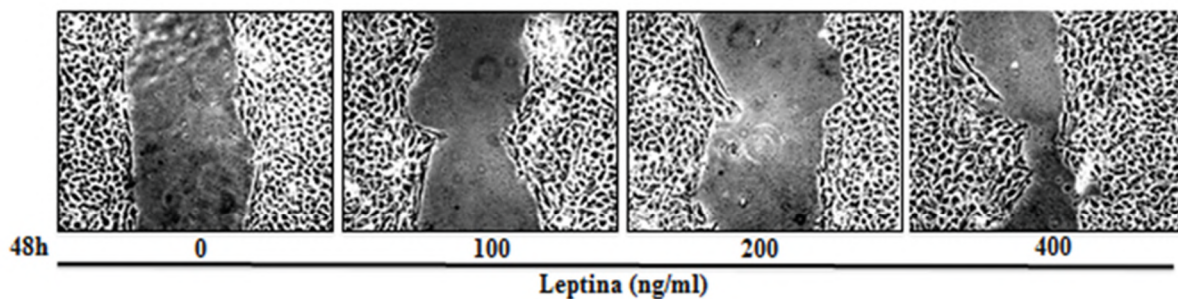
Introducción

En México, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Estudios epidemiológicos sugieren que el sobrepeso y la obesidad están relacionados con un incremento en el riesgo para varios tipos de cáncer, entre los que destaca el cáncer de mama. Se estima que el 20% de las muertes por cáncer en mujeres son atribuidas al sobrepeso y la obesidad (Calle, Rodriguez, Walker-Thurmond y Thun, 2003), esto debido a que en la obesidad existe un descontrol metabólico como son estados de hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y sobreproducción de proteínas por parte de los adipocitos que pueden actuar

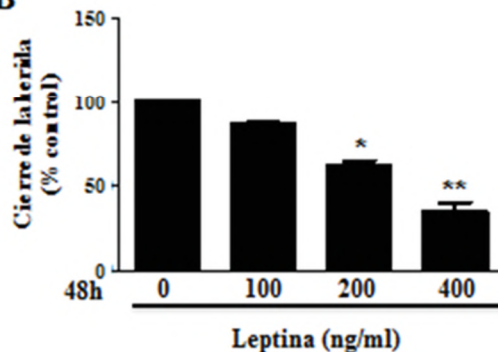
como factores de crecimiento y promover la proliferación, migración, invasión y metástasis de las células cancerosas (Yakar, Leroith y Brodt, 2005).

Un evento crucial en la metástasis es la transición epitelio-mesénquima [TEM], la cual es un proceso de transdiferenciación celular de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal. La TEM está implicada en la progresión tumoral hacia un fenotipo maligno de las neoplasias; este proceso incluye la pérdida de las uniones célula-célula, pérdida de la polaridad ápico-basal y un aumento en las capacidades migratorias e invasivas de las células. A nivel molecular existen marcadores de la TEM tales como: disminución de la proteína E-cadherina y el incremento de vimentina, la

A



B



C

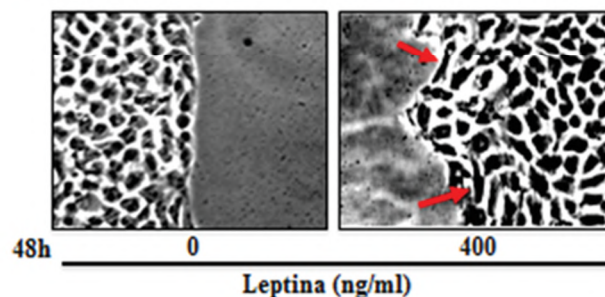


Figura 1. La leptina induce la migración de células MCF10A. Panel A. Se utilizaron cultivos celulares de la línea celular MCF10A a una confluencia total, posteriormente se realizó supresión de suero por 4 h y la realización de la ralladura con una punta estéril seguido de una estimulación con leptina a diferentes concentraciones 0, 100, 200, 400 ng/ml, las fotografías fueron tomadas a las 48 h después del tratamiento. Panel B. La gráfica muestra el área abierta de la herida. Panel C. Acercamiento de la herida, la comparación se realizó entre el vehículo (células sin estímulo) y la mayor concentración de leptina (400 ng/ml). La gráfica corresponde al análisis estadístico mediante ANOVA obtenido de la medición del cierre de herida. Significancia estadística: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

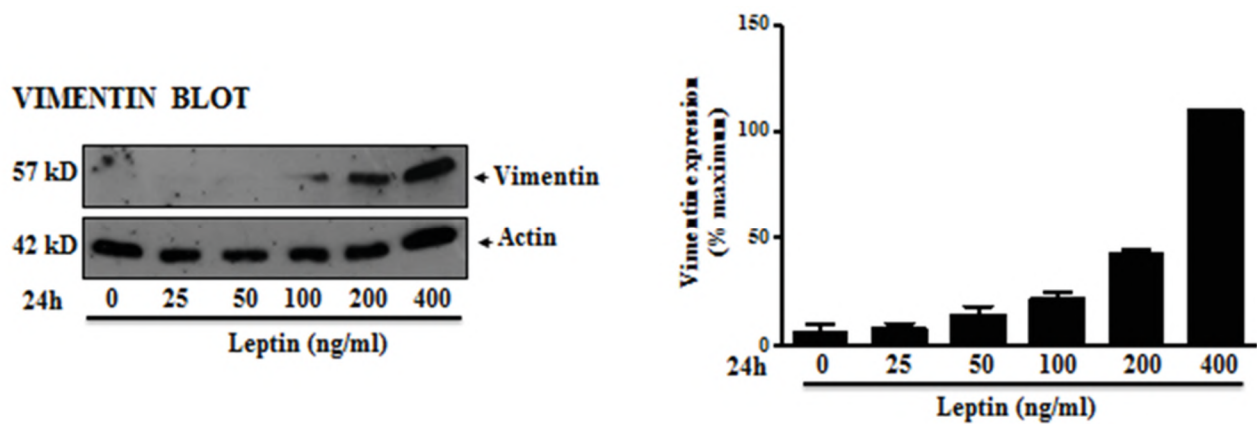


Figura 2. Expresión de vimentina por Western blot. Se utilizaron cultivos celulares de la línea celular MCF10A a una confluencia total, posteriormente se realizó supresión de suero por 4 h y tratamiento con leptina a 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml de leptina por 24 h, posteriormente se realizó Western blot para medir los niveles proteicos de vimentina, la comparación se realizó con el vehículo (células sin tratamiento). La grafica corresponde al análisis estadístico mediante t-student. Significancia estadística: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

secreción de metaloproteinasas de matriz [MMPs], aumento en la migración e invasión celular. Vimentina es un componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto, se le ha relacionado con cambios morfológicos hacia un fenotipo mesenquimal y con el aumento en la migración celular. Se ha descrito la sobreexpresión de vimentina en células mesenquimales por lo que se considera como marcador del fenotipo mesenquimal en células tumorales (Méndez, Kojima y Goldman, 2010).

Durante la invasión y metástasis las células tumorales degradan la membrana basal epitelial hasta invadir el estroma, posteriormente realizan intravasación a través de vasos sanguíneos y linfáticos para finalmente extravasarse y establecer una nueva colonia tumoral. Las metaloproteinasas de matriz [MMPs] son proteínas que participan activamente en estos procesos, ya que son enzimas con actividad proteolítica, cuyo mecanismo de acción es la degradación de proteínas de matriz extracelular; las MMPs tipo gelatinasas [MMP-2] y [MMP-9] son secretadas por las células tumorales y las que tienen un papel muy importante durante el proceso metastásico (Egeblad y Werb, 2002).

La leptina es una hormona secretada por los adipocitos, regula procesos celulares como la proliferación, migración e invasión en diversos tipos celulares, su acción es mediada por la unión al receptor Ob-Rb (Garofalo, Koda, Cascio, Sulkowska, Kanczuga-Koda, Golaszewska, Russo et al, 2006; Perera, Chin, Duru y Camarillo, 2008). La interacción de leptina con su receptor activa vías de señalización intracelulares como las de JAK/STAT3, MAPK y PI3K contribuyendo a un aumento en la proliferación y migración celular. Sin embargo, actualmente no hay reportes del papel de la leptina como inductora de la TEM en células de epitelio de mama no tumoral MCF10A. Por lo anterior el objetivo del trabajo fue evaluar el papel de la leptina como inductora de la TEM mediante la promoción de eventos relacionados con el inicio y progresión del cáncer de mama, incluyendo la secreción de MMPs, la expresión de vimentina y el incremento en la migración celular.

Material y métodos

Ensayos de migración por cierre de herida

En este estudio se utilizó la línea celular de epitelio mamario no tumoral MCF10A, las cuales fueron crecidas en medio DMEM/F12 con 5% de suero fetal bovino, 20 ng/ml de EGF, 0.5 μ g de hidrocortisona y 10 μ g/ml de insulina. Para la estimulación celular, los cultivos se sometieron a supresión de suero por 4 h y posteriormente se realizaron ensayos de migración de dosis-respuesta con leptina empleando 0, 25, 50, 100, 200, 400 ng/ml durante 48 h de estímulo. Cuando las células alcanzaron confluencia total se les realizó una ralladura sobre el cultivo usando una punta de pipeta estéril. El progreso de la migración mediante el ensayo de cierre de herida fue analizado y fotografiado a las 48 h de estímulo usando un microscopio óptico acoplado a una cámara fotográfica; en este ensayo se utilizó AraC (30 μ M) como inhibidor de proliferación, cada condición experimental se realizó por triplicado.

Western Blot

Los cultivos celulares de la línea MCF10A fueron lisados con RIPA para obtener los extractos proteicos; las proteínas fueron separadas en geles de acrilamida al 10% seguida por una transferencia a membranas de nitrocelulosa. Posterior a la transferencia las membranas fueron bloqueadas usando 5% de leche libre de grasa en buffer de solución salina (PBS) pH 7.2/0.05% Tween 20, se incubaron toda la noche con anticuerpo primario (1:1000) a 4°C, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05% y se incubaron con anticuerpo secundario (1:5000) por 2 horas a 22°C en agitación constante. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas con un estuche de quimioluminiscencia (NOVEX). Las bandas fueron identificadas en placas autoradiográficas. Se empleó anticuerpo monoclonal para Vimentina (clona V9) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA.).

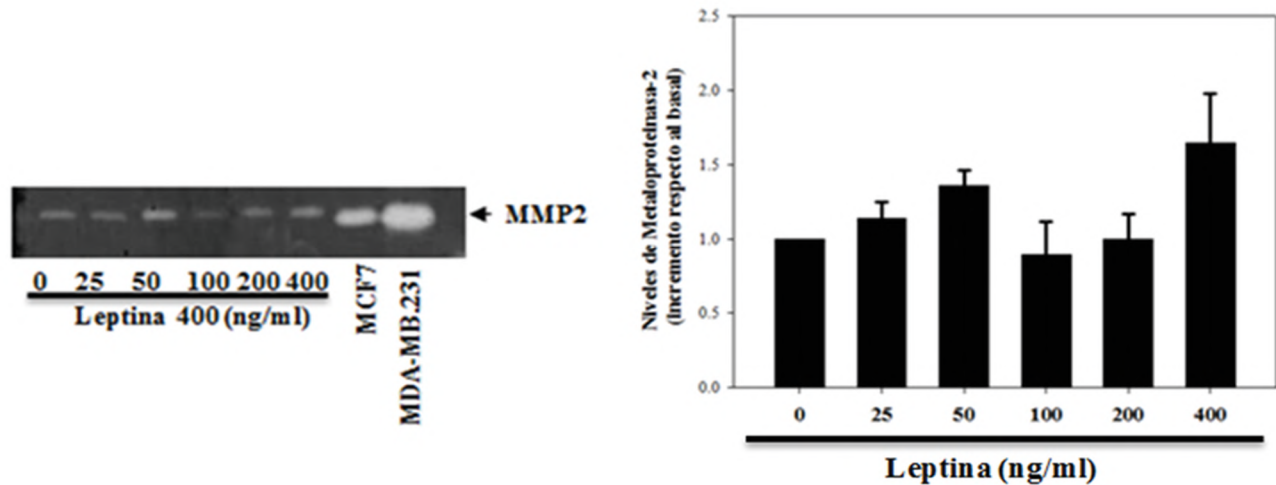


Figura 3. Actividad proteolítica de la metaloproteína 2 mediante zimografía en gelatina. Se utilizó el medio condicionado (sobrenadantes) de cultivos celulares de la línea celular MCF10A a una confluencia total, posteriormente se realizó supresión por 4 h y tratamiento con leptina a 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml de leptina por 48 h, posteriormente se realizó zimografía para medir la capacidad proteolítica de la MMP2, la comparación se realizó con el vehículo (células sin tratamiento). La grafica corresponde al análisis estadístico mediante t-student.

Zimografía en gelatina

Para determinar la secreción de la MMP-2 los cultivos de MCF10A fueron puestas en supresión de suero por 4 horas y fueron tratadas con 25, 50, 100, 200, 400 y 800 ng/ml de leptina por 48 h. La actividad proteolítica de la MMP-2 fue evaluada a partir de los sobrenadantes de los cultivos en medios condicionados usando geles de acrilamida copolimerizados con gelatina 1mg/ml. El medio condicionado fue mezclado con buffer de muestra para MMPs (2.5% SDS, 1% sacarosa y 4µg/ml de rojo fenol). Posteriormente se realizó una electroforesis a 72 V por 2 h, los geles fueron lavados tres veces con Tritón X-100 al 2.5% para remover el SDS y se incubaron con buffer de incubación (50mM Tris/HCl pH 7.4, 5mM CaCl₂) a 37°C por 48 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G-250 al 0.25% (metanol al 30% y ácido acético al 10%) por 40 min y posteriormente destañados con solución destañadora (etanol 20%, ácido acético 15% y agua ultrapura) por 40 min, la actividad proteolítica fue detectada como bandas claras en el gel, como controles positivos se usaron sobrenadantes de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

Resultados

La leptina induce migración celular en la línea de epitelio de mama no tumoral MCF10A

Para evaluar el efecto de la leptina como inductora de la migración celular en las células MCF10A se realizó ensayos de migración por cierre de herida a dosis de 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml; en el caso de las dosis de 25 y 50 ng/ml de leptina no se observó una migración evidente, mientras que en las dosis de 100, 200 y 400 ng/ml de leptina se observó migración celular respecto al control; en el caso de la dosis de 400 ng/ml se observó el cierre casi total de la herida (véase figura 1).

La leptina induce el aumento en la expresión de vimentina en células MCF10A

Analizamos la expresión de vimentina mediante Western Blot para determinar sus niveles proteicos tras la estimulación con leptina, los resultados muestran que los niveles de vimentina aumentaron de manera proporcional a las dosis de leptina, siendo la dosis de 400 ng/ml donde se observó un incremento de vimentina de más de 100 veces respecto al control (véase figura 2).

La leptina induce la secreción y actividad proteolítica de la MMP-2

Analizamos la secreción y actividad proteolítica de la MMP-2 usando el medio condicionado mediante ensayos de zimografía en geles copolimerizados con gelatina, realizamos tratamientos empleando dosis de 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml de leptina durante 48 h de tratamiento, observamos que en las dosis de 50 y 400 ng/ml de leptina una mayor secreción y capacidad proteolítica de la MMP2 (véase figura 3).

Discusión y conclusiones

La transición epitelio-mesénquima es inducida por diversos estímulos como factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular (MEC). Recientemente se ha identificado a la leptina como inductora de la TEM en células MCF-7 y MDA-MB-231 (Yan, Avtanski, Saxena, y Sharma, 2012) las cuales son líneas celulares de cáncer de mama poco invasivas y altamente invasivas respectivamente, en células MFC10A no se ha descrito este evento.

En los resultados obtenidos en este trabajo, se observa que existe un incremento en los niveles de expresión de vimentina de manera proporcional a la dosis de leptina, lo cual concuerda con los cambios morfológicos de un fenotipo mesenquimal y un incremento en la capacidad migrato-

ria de las células MCF10A tratadas con leptina. En diversos estudios vimentina se ha relacionado con cambios morfológicos de fenotipo mesenquimal (Méndez et al., 2010; Gilles, Polette, Zahm, Tournier, Volders, Foidart y Birembaut, 1999), aumento en la migración y adhesión celular; el mecanismo por el cual favorece el desarrollo de la TEM es mediante la activación de Axl, produciendo cambios morfológicos en la célula de fenotipo mesenquimal favoreciendo la TEM (Ivaska, 2011, Vuoriluoto, Haugen, Kiviluoto, Mpindi, Nevo y Gjerdrum, 2011).

La secreción de MMPs es una característica de las células tumorales las cuales tienen como función la degradación de proteínas de la MEC contribuyendo de esa manera a la invasión celular, en el caso de la MMP-2 tiene capacidad gelatinasa pudiendo degradar proteínas presentes en la MEC como un mecanismo para favorecer la migración e invasión celular. Por otro lado, las MMPs están implicadas en la TEM por su capacidad de contribuir a la progresión tumoral de las células epiteliales. Como parte de la TEM la secreción de MMP-2 ha sido evaluada en células MCF10A determinando que NFκB regula su expresión (Espinoza Neira, Mejia-Rangel, Cortes-Reynosa y Perez Salazar, 2012, Martínez-Orozco, Navarro-Tito, Soto-Guzman, Castro-Sanchez y Pérez, 2010). En nuestros resultados las dosis de 50 y 400 ng/ml de leptina fueron las dosis a las que se observó un incremento de esta capacidad proteolítica de la MMP-2, estos resultados dan evidencia de la inducción de la TEM en células MCF10A tratadas con leptina y este es un modelo que contribuye al entendimiento de lo que pudiera estar ocurriendo *in vivo* en mujeres con niveles altos de leptina y con inicio de tumorigénesis mamaria.

Referencias

- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. y Thun, M. J. (2003). Overweight, obesity and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *New England Journal of Medicine*. 348, 1625–1638.
- Egeblad M. y Werb Z., 2002. New functions for the matrix metalloproteinases cancer progression. *Nature reviews* 2: 161-172.
- Espinoza-Neira, R., Mejia-Rangel, J., Cortes-Reynosa, P. y Perez Salazar, P. (2011). Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *International Journal of Biochemistry*. 43, 1782-1791.
- FASEB Journal. 6, 1838-1851.
- Garofalo, C., Koda, M., Cascio, S., Sulkowska, M., Kanczuga-Koda, L., Golaszewska, J., Russo, A., Sulkowski, S. y Surmacz, E. (2006). Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity related stimuli. *Clinical Cancer Research*. 12, 1447-53.
- Gilles, C., Polette, M., Zahm, J. M., Tournier, J. M., Volders, L., Foidart, J. M. y Birembaut P. (1999). Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *Journal of Cell Science*. 112, 4615-4625.
- Ivaska, J. (2011). Vimentin, Central hub in EMT induction? *Small GTPases*. 2, 51-53.
- Martínez-Orozco, R., Navarro-Tito, N., Soto-Guzman A., Castro-Sanchez, L. y Pérez S. E. (2010). Arachidonic acid promotes epithelial-to-mesenchymal-like transition in mammary epithelial cells MCF10A. *European Journal of Cell Biology*. 89, 476-488.
- Méndez, M. G., Kojima, S. I. y Goldman, R. D. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition
- Perera, C., Chin, H.G., Duru, N. y Camarillo, I.G. (2008). Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression. *Endocrinology*. 199, 221-33.
- Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J. P., Nevo, J. y Gjerdrum, C. (2011). Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 30, 1436-48.
- Yakar, S., Leroith, D. y Brodt (2005). The role of the growth hormone/insulin like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 16, 407–420.
- Yan, D., Avtanski, D., Saxena, N. J. y Sharma D. (2012) Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β-catenin activation via Akt/ GSK3- and MTA1/Wnt protein-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 11, 8598-8612.