



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

**“EFECTO DE LEPTINA SOBRE LA MIGRACIÓN Y
PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA TUMORAL MDA-MB 231”**

Tesis presentada para obtener título de:

Maestría en Ciencias Fisiológicas

Presenta: Q.F.B. Erika Venancio García

Director de Tesis

Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán

JULIO 2015

RESUMEN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial el cual representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se considera a la obesidad como un factor de riesgo para el desarrollo de metástasis de tumores primarios ya que en dicha condición hay niveles elevados de adipocinas, destacando entre ellas la hormona leptina.

Por otro lado, se ha asociado a la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales con la expresión de diversas proteínas; entre ellas, los canales e intercambiadores iónicos.

Demostramos que las células de la línea tumoral MDA-MB 231 expresan el ARNm y proteína del receptor a leptina (ObR) y que a través de su unión específica es capaz de exacerbar los niveles de expresión del ARNm que codifica para la isoforma $Na_v 1.5$ de la subunidad alfa del canal de sodio. Así como de otra proteína involucrada en la capacidad invasiva de las células tumorales, la isoforma NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ ; en ambos casos el efecto depende tanto de la concentración de leptina como de la duración del tratamiento.

Asimismo, encontramos que el incremento en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 tras el tratamiento con leptina (200 nM) durante 48 horas, se debe al menos a la sobre-expresión funcional de la subunidad $Na_v 1.5$ del canal de sodio dependiente de voltaje $Na_v 1.5$, ya que al incubar las células en presencia de TTX (10 μ M) se inhibe el efecto estimulador de leptina.

Los resultados del presente trabajo señalan que la estimulación tónica con leptina exagera la capacidad migratoria en un modelo celular de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB 231), donde dicho efecto es mediado a través de la participación de dos proteínas de membrana: el canal de sodio dependiente de voltaje isoforma $Na_v 1.5$ y el intercambiador Na^+/H^+ isoforma NHE1. Sin embargo no se observaron cambios sobre la capacidad proliferativa en este mismo modelo celular.

ÍNDICE

ANTECEDENTES	4
1. CÁNCER	4
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS TUMORALES	4
3. EPIDEMIOLOGÍA	5
4. CÁNCER DE MAMA (CAM)	5
5. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A CÁNCER DE MAMA	6
6. RELACIÓN OBESIDAD Y CÁNCER	8
7. LEPTINA	8
8. ASOCIACIÓN ENTRE LEPTINA Y CÁNCER DE MAMA	9
9. INTERCAMBIADORES	10
INTERCAMBIADOR NHE	11
10. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE	13
CANALES DE SODIO	13
RELACIÓN ENTRE CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE Y CÁNCER	14
11. MODELO CELULAR DE CÁNCER DE MAMA: LÍNEA CELULAR MDA-MB 231	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	21
METODOLOGÍA	22
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ANTECEDENTES

1. Cáncer

La OMS define al cáncer como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y puede invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis (WHO, 2015).

Las células cancerosas no responden a las señales que controlan el crecimiento celular y proliferan de forma excesiva, creando su propio mecanismo de nutrición mediante factores angiogénicos. El tiempo de crecimiento de los distintos tipos de tumores es variado, cuando el tumor no sobrepasa la membrana basal de los epitelios se llama *In situ*, cuando llega a destruir esa membrana basal comienza la invasión a otros órganos provocando metástasis.

2. Características de las células tumorales

Las características de las células tumorales comprenden capacidades biológicas adquiridas durante el proceso de desarrollo del tumor, el cual incluye múltiples pasos clave que llevan a la adquisición de un fenotipo celular maligno. Hanahan y Weinberg en el año 2000, describieron las seis características distintivas de las células tumorales, las cuales comprende señalización proliferativa sostenida, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, activación de la inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, activación de invasión y metástasis.

Avances en la última década han añadido cuatro características, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción por el sistema inmune las cuales se consideran como características emergentes. Subyacente a estas propiedades se encuentran la inestabilidad genómica y la inflamación. Una característica particular de los tumores, es su capacidad para reclutar un repertorio de células normales que constituyen el estroma asociado al tumor en el desarrollo y tumoral y contribuye a la adquisición de rasgos distintivos mediante la creación de microambiente tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011)

3. Epidemiología

El cáncer es considerado una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Durante el año 2012 se detectaron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes asociadas con cáncer. (Informe mundial sobre el cáncer 2014). A nivel mundial, se prevé que el número de nuevos casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas.

Los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, estómago, hígado colon y recto; mientras que en la mujer el primer lugar es ocupado por el cáncer de mama, seguido por cáncer de colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (IARC, 2014)

4. Cáncer de mama (CaM)

Se define al cáncer de mama como una enfermedad en la cual se desarrollan células malignas en el tejido de la glándula mamaria. El tipo de cáncer más común es el carcinoma ductal, el cual comienza en el revestimiento de los conductos de la leche. Otro tipo de cáncer de mama es el carcinoma lobulillar, que comienza en los lobulillos del seno. El cáncer de mama invasivo es aquel que se extiende desde donde comenzó en los conductos o lobulillos mamarios al tejido normal circundante. Instituto Nacional de Cáncer.

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres de todo el mundo, de tal forma que representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519 000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, el 60% de las defunciones se registran en países en desarrollo (OMS, Carga Mundial de Morbilidad, 2004).

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos (Coleman et al., 2008).

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de América Latina y el Caribe (ALCA), tanto en número de casos nuevos como en número de muertes. De acuerdo con estadísticas de la PAHO, durante el año 2012 fueron diagnosticadas en las

Américas con cáncer de mama, más de 408 000 mujeres y 92 000 fallecieron a causa de esta enfermedad. La proporción de mujeres fallecidas por cáncer de mama con menos de 65 años es más alta en ALCA (57%) que en Norteamérica (41%).

De acuerdo a predicciones basadas en el crecimiento poblacional, se estima que en el año 2030 se presentarán más de 596.000 nuevos casos y más de 142.100 muertes por cáncer de mama. El incremento en número de nuevos casos y muertes será casi el doble en América Latina y el Caribe en comparación con Norte América (GLOBOCAN, 2012)

En México a través de los años, la mortalidad por cáncer de mama ha ido en aumento paulatinamente, ya que en 14 años ha crecido el nivel de 14.7 a 17.2 muertes por cada 100 mil mujeres mayores de 25 años (INEGI, 2013). El nivel de mortalidad de cáncer de mama por grupos de edad varía de forma significativa; en mujeres con edades de 25-49 años la tasa de mortalidad es de 7.2; para mujeres entre 50-64 años la tasa de mortalidad es de 31.3 y para las mujeres mayores a 65 años la tasa se eleva significativamente a 45.9 muertes por cada 100 mil mujeres.

5. Factores de riesgo asociados a cáncer de mama

Edad. Constituye uno de los factores de riesgo más importantes. Se ha establecido una relación directamente proporcional entre el incremento de edad y mayor riesgo de desarrollar cáncer mama. Aproximadamente uno de ocho cánceres de mama se detecta en mujeres menores de 45 años de edad, mientras que aproximadamente dos de tres cánceres invasivos del seno se encuentran en mujeres de 55 años o más (ACS). No obstante, los tumores diagnosticados en mujeres menores de 35 años, tienen peor pronóstico y se presentan como cáncer mamario triple negativo (Bonnier P et al., 1995, Park BW et al., 2002).

Historia Familiar. De acuerdo con datos de la OMS, los antecedentes familiares de cáncer de mama multiplican el riesgo por dos o tres, debido a la presencia de mutaciones principalmente en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *P53*, asociándolo a riesgo muy elevado de ese tipo de cáncer. Se estima que las mutaciones de estos genes son responsables del 20% de los casos de cáncer de mama familiar y del 80% de las familias con cáncer precoz de mama y ovario (OMS, 2013).

Origen étnico. De acuerdo con algunos estudios (Kuderer NM et al. 1996; Fein D et al. 1996), se ha observado que en mujeres blancas el riesgo es 1.2 veces mayor que en mujeres negras. Sin embargo, aunque las mujeres de raza blanca tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, presentan peor pronóstico las mujeres de raza negra. Algunos estudios han comprobado que las pacientes de raza negra asociaban mayor afección axilar, mayor tamaño tumoral y menor índice de positividad para receptores hormonales (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001).

Factores ambientales. Danaei y colaboradores (Danaei et al., 2005) han calculado la contribución de diversos factores de riesgo modificables, exceptuando los factores reproductivos, a la carga global de cáncer de mama. De acuerdo con su estudio, el 21% de todas las muertes por cáncer de mama registradas en el mundo son atribuibles al consumo de alcohol, sobrepeso, obesidad y falta de actividad física. Esa proporción fue mayor en los países de ingresos altos (27%) y el factor más importante fue el sobrepeso y la obesidad.

Dieta. La dieta es el principal determinante de la composición corporal. De acuerdo con la OMS aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, consumo de tabaco, consumo de alcohol, falta de actividad física (OMS, 2013).

Obesidad. Existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan a la obesidad con el riesgo de padecer cáncer (Pan & DesMeules, 2009). El impacto de la obesidad con respecto al desarrollo de cáncer es el resultado de un proceso multifactorial que involucra alteraciones a nivel endocrino que posiblemente actúan de forma cooperativa en la carcinogénesis. Dichas alteraciones se presentan en las concentraciones de hormonas endógenas, tal como insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y hormonas sexuales esteroideas, los cuales pueden modificar la proliferación celular, apoptosis, angiogénesis (Calle & Kaaks, 2004). Asimismo, la inflamación crónica de bajo grado da lugar a la alteración en los niveles de adipocinas (leptina, TNF- α , IL-6, CRP, adiponectina) que probablemente afectan el proceso de mitosis, apoptosis y angiogénesis.

6. Relación Obesidad y Cancer

El incremento crónico en la ingesta calórica provoca que los adipocitos sufran de un proceso hipertrófico e hiperplásico enfrentándose a diversas agresiones tal como hipoxia, estrés oxidativo e interrupción en la vía secretora de proteínas. Como consecuencia, los adipocitos pierden funcionalidad y disminuyen su eficiencia en el cumplimiento de su función primaria, almacenamiento y neutralización de lípidos potencialmente dañinos (Percick & Stumvoll; 2009).

Se ha estudiado ampliamente la disfuncionalidad de los adipocitos como una causa importante en el desorden metabólico asociado a obesidad incluyendo resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular, inflamación crónica y cáncer debido a una liberación inapropiada de factores mitogénicos y factores pro-inflamatorios (Guilherme y cols; 2008; Blüher M; 2009) dentro de estos factores mitogénicos podemos mencionar gran variedad de adipocinas, sin embargo; un lugar especial lo ocupa la hormona leptina.

7. Leptina

Es una hormona peptídica de 16 kDa, constituida por 167 aminoácidos, es codificada por el gen *ob*, localizado en humanos en el cromosoma 7q31.3, mientras que en los ratones en el cromosoma 6 (Zhang et al., 1994).

La estructura proteica de leptina consta de un conjunto de 4 hélices que la hace similar a la superfamilia de citocinas de 4 hélices agrupadas de cadena larga (Zhang y cols., 1997) y posee una similitud estructural con la IL-6, las interleuquinas 12 (IL-12) y 15 (IL-15), el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), oncostatina M (OSM), prolactina (PRL) y hormona del crecimiento (GH).

Leptina fue la primera hormona identificada entre las liberadas por los adipocitos. Se sabe que la concentración de leptina se correlaciona positivamente con la grasa corporal total, estado nutricional del individuo y contenido de triglicéridos en los adipocitos; por lo que, niveles séricos de leptina son elevados en individuos obesos comparados con individuos de peso normal actuando como un marcador de las reservas energéticas del organismo (Saglam y cols, 2003). En humanos, los niveles de leptina en sangre parecen correlacionarse directamente con la grasa corporal y puede incrementar los niveles de 3

ng/ml en sujetos no obesos a niveles más altos de 100 ng/ml en personas obesas (Blum et al., 1998).

La adipocina leptina actúa tanto a nivel central como a nivel periférico como un importante regulador del peso corporal y del metabolismo, incrementando el consumo de energía y la pérdida de tejido adiposo, así como en la función reproductiva. A nivel hipotalámico, ejerce su función en los centros reguladores del hambre y de la saciedad, gasto energético, temperatura corporal, y es un informante del estado nutricional que guarda el organismo (Hamann & Matthaei, 1996), asimismo, está asociada a otras funciones fisiológicas, como la inmunidad y hematopoyesis (Huang & Li, 2000).

Para llevar a cabo la gran diversidad de acciones, leptina se une a su receptor específico, conocido como ObR. Se ha propuesto que la isoforma OBR-b es la forma funcional del receptor a leptina, posee un dominio intracelular de 300 aminoácidos altamente conservado entre las especies, posee regiones o motivos característicos que permiten la interacción con proteínas accesorias para la activación de vías de señalización intracelular (Tartaglia, 1997; Chua et al., 1997; Tartaglia, 1995).

8. Asociación entre leptina y cáncer de mama

Muchos estudios epidemiológicos muestran que los niveles de leptina en mujeres con tumores de mama son más altos que en mujeres sanas (Maccio A et al., 2009, Hancke et al. 2010, Tessitore et al., 2004; Hou et al. 2007; Ozet et al. 2001; Han CZ et al. 2008); encontrando de tal forma una correlación positiva entre leptina y el tamaño del tumor (Chen DC et al. 2006; Dalamaga M et al. 2013). Por lo tanto, la hiperleptinemia parece ser un factor asociado con la presencia de metástasis y una baja tasa de supervivencia (Carroll PA et al., 2011).

Estudios preclínicos in vivo utilizando células de cáncer humano en modelos ortotópicos han reportado que tumores agresivos que se desarrollan a partir de células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB 231) se incrementa la concentración de la isoforma larga del receptor de leptina en comparación con tumores no agresivos que se formaron a partir de células MCF-7 (Ray A et al., 2007). También se ha visto que tumores formados con células MCF-7 que se desarrollaron en ratones mantenidos con una dieta baja en grasas mostraron una alta expresión en los niveles tanto de leptina como del receptor de leptina

en comparación con tumores de ratones que llevaron una dieta alta en grasas, lo que probablemente estaba asociado con resistencia a leptina (Grossmann ME et al., 2010).

En un estudio realizado por Dubois et al. 2014 observó que el tratamiento con concentraciones fisiológicas, patológicas y farmacológicas de leptina no modifica la proliferación celular de la línea tumoral MDA-MB 231, lo cual fue corroborado mediante la utilización de diferentes técnicas para evaluar proliferación. Las células de cáncer de mama fueron tratadas con diferentes concentraciones de leptina niveles fisiológicos (10 ng/mL), niveles asociados a obesidad (100 ng/mL) y concentraciones farmacológicas (1000 ng/mL) por 96 horas. Por tanto, leptina no modifica la proliferación independiente del tiempo de incubación, dosis y técnicas utilizadas. Sin embargo, si encontraron aumento significativo en la proliferación de la línea celular MCF-7 y T47D.

Por otra parte, McMurtry et al. 2009 y Kim et al 2011 mostraron que leptina a la concentración de 100 ng/mL estimula la migración e invasión de líneas celulares de cáncer de mama positivas y negativas al receptor de estrógenos (MCF-7 y MDA-MB 231) *in vitro*, así como la expresión de metaloproteinasa-2 (MMP-2). Además estudios clínicos de una alta prevalencia han detectado la presencia de metástasis a sitios distantes lo cual se ha asociado a elevados niveles tanto de leptina como de su receptor en células epiteliales de cáncer de mama (Ishikawa M et al. 2004).

La progresión del cáncer involucra que las células adquieran capacidad de migrar a un sitio lejano a su lugar de origen, lo cual se ha asociado con la expresión funcional de proteínas integrales de membrana tal como canales iónicos dependientes de voltaje e intercambiadores iónicos (Prevaskaya et al., 2010, Reshkin et al., 2000).

9. Intercambiadores

Los tumores sólidos se caracterizan por presentar una condición de hipoxia, como resultado de anomalías en la estructura y función de los vasos sanguíneos que irrigan al tejido tumoral, produciéndose una reducción en el aporte de oxígeno y nutrientes. Por lo tanto, para satisfacer su demanda energética, las células tumorales cambian a un metabolismo glucolítico, dando como resultado un incremento en el consumo de glucosa y una alta producción de lactato y protones (Helmlinger et al., 2002; Raghunand et al.,

2003), alterando de manera significativa el pH intracelular (Griffiths, 1991) que afecta a su vez la señalización intracelular (Ahmad et al., 2004).

De esta forma las células cancerosas tienen un equilibrio ácido-base completamente diferente al observado en tejido normal e incrementa de acuerdo al estado neoplásico: un microambiente extracelular ácido (pH_e) asociado a un pH intracelular (pH_i) alcalino maligno.

Tanto en estudios de cultivo celular in vitro como en estudios espectroscópicos utilizando el isótopo ^{31}P han reportado que las células tumorales tienen un pH intracelular alcalino (7.12-7.65 en comparación con el tejido normal 6.99-7.20) y un pH extracelular intersticial ácido (6.2-6.9 en comparación con el tejido normal 7.3-7.4). Por tanto, el ambiente tumoral extracelular es más ácido que el ambiente intracelular, creando así un gradiente de pH revertido a través de la membrana celular, el cual incrementa conforme el tumor progresa.

El desarrollo y mantenimiento de este gradiente es directamente debido a la capacidad de las células tumorales para secretar protones (H^+) y acidificar el ambiente extracelular. Esta secreción de protones depende de la capacidad buffer de la célula y de intercambiadores iónicos tal como, transportador de monocarboxilatos (MCT), intercambiador HCO_3^-/Cl^- dependiente de sodio y principalmente el intercambiador Na^+/H^+ (NHE)

Intercambiador NHE

Los intercambiadores Na^+/H^+ (NHE) son proteínas de transporte que se encuentran en la membrana plasmática y que intercambian Na^+ extracelular por H^+ intracelular con una estequiometría 1:1 (Grinstein et al., 1989; Murer et al., 1976). En el humano, se han identificado 9 isoformas del intercambiador (*NHE1-NHE9*) (Onishi et al., 2012). La isoforma más comúnmente detectada en las células tumorales es la tipo 1 (NHE1)

NHE1 regula el intercambio electro neutral de sodio extracelular por protones intracelulares a través de la membrana celular, K_m para el sodio extracelular es de 10-50 mM. A través de su acción, el gradiente de sodio de entrada puede controlar la extrusión cuesta arriba de protones que alcaliniza el pH_i y acidifica el pH_e .

Una de las características fundamentales es su sensibilidad al pH_i a través de un sitio alostérico interno de unión a protones tal que cuando pH_i cae por debajo de un nivel umbral al cual este es activado y, de esta forma, los protones intracelulares son un

importante regulador alostérico de la actividad de NHE1 independientemente de su función como un sustrato para el intercambio con sodio externo (Aronson et al. 1982)

Relación entre intercambiador Na^+/H^+ NHE1 y cáncer de mama

Se ha observado que NHE1 ejerce un efecto importante en la migración e invasión de células tumorales. En algunos tipos de cáncer, el intercambiador NHE1 se encuentra involucrado en la regulación del pH, éste fenómeno es importante para la formación de invadopodios, estructuras que permiten a las células la migración e invasión (Cardone et al., 2005).

La participación de NHE1 en la capacidad migratoria de las células tumorales es apoyada por los trabajos de Reshkin y colaboradores (2000), quienes encontraron que la actividad de NHE1 incrementa la capacidad invasiva de células de carcinoma de mama humano (MDA-MB 231)

Algunos grupos de investigación han demostrado la importancia del intercambiador NHE1, por una parte Onishi et al. 2012 demostraron que sobre-expresando el intercambiador NHE1 en una línea celular triple negativo (MDA-MB 231) la capacidad invasiva se exagera. Por su parte Amith et al. 2015 llevaron a cabo experimentos de silenciamiento de NHE1 en la línea celular MDA-MB 231 y evaluaron migración (ensayo de cierre de herida), invasión celular (cámaras de *transwell*) y formación de tumores (ensayos *in vivo*); de tal forma que se reduce la capacidad de formación de tumores, migración e invasión celular.

Estudios llevados a cabo por Brisson et al. 2011 encontraron que el intercambiador Na^+/H^+ isoforma I (NHE1) es el regulador central del pH intracelular en la línea celular triple negativo MDA-MB 231 y que su actividad se ve acrecentada por el funcionamiento de un canal de sodio dependiente de voltaje, en específico la isoforma $\text{Na}_v1.5$ de la subunidad alfa de dicho canal, indicando que estas dos proteínas colocalizan en fracciones de membrana las cuales contienen caveolas, proponiendo que pudiera haber una interacción dinámica entre ellas.

10. Canales iónicos dependientes de voltaje

Los canales iónicos son complejos multiméricos de proteínas de membrana que facilitan la difusión de iones a través de la membrana celular. La función principal de los canales iónicos es importante para diversos procesos celulares tal como el mantenimiento del potencial de membrana y la propagación de los potenciales de acción.

Los canales iónicos, particularmente los canales de sodio dependientes de voltaje, han sido implicados en muchos aspectos de la patología del cáncer, incluyendo crecimiento no regulado, disminución de la apoptosis, angiogénesis, migración, invasión y metástasis (Prevarskaya et al., 2010).

Canales de sodio

Los canales de sodio dependientes de voltaje están constituidos por una subunidad α que forma un poro funcional (220-260kDa), la cual se encuentra asociada con una o más subunidades β (Abdul & Hoosein, 2001). La familia de genes que codifican para la subunidad α está conformada por diez miembros SCN1A-SCN11A, que generan las subunidades $\text{Na}_v 1.1$ - $\text{Na}_v 1.9$ y Na_x (Goldin et al., 2000). Mientras que para la subunidad β se han identificado cuatro genes SCN1B-SCN4B, que codifican para las subunidades $\beta 1$ - $\beta 4$ (Brackenbury, 2008).

Las subunidades β son consideradas moléculas multifuncionales debido a que aceleran la cinética de los canales, incrementan la expresión de canales en la superficie celular *in vitro* (Isom et al., 1992). Asimismo, son las únicas entre las subunidades auxiliares de canales que tienen la capacidad de funcionar como: moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas, promoviendo la adhesión *in vitro*, tanto en presencia y ausencia de la subunidad α (Isom & Catterall 1996; Isom et al., 1994; Malhotra et al., 2000; McEwen et al., 2004).

Los canales de sodio dependientes de voltaje se encuentran expresados en diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama (Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003), cáncer de próstata (Grimes et al., 1995; Laniado et al., 1997). Así también se encuentran presentes las subunidades β_1 , β_2 y β_4 en células de cáncer de mama y CaP (Chioni et al., 2006; Diss et al., 2007).

Relación entre canales de sodio dependientes de voltaje y cáncer

De forma clásica los canales iónicos dependientes de voltaje se encuentran principalmente en células excitables, tal como neuronas y células musculares donde son responsables de la generación y conducción del potencial de acción (Hille, 1992). Sin embargo, también se ha observado que se encuentran ampliamente expresados en células no excitables, incluyendo microglia, astrocitos, células de la respuesta inmune, fibroblastos y células cancerosas (Black et al. 2013)

Las células no excitables comparten con las células excitables diversos mecanismos de respuesta a estímulos, aunque no generan potenciales de acción. Su papel se encuentra asociado a la transducción de señales provenientes del medio que las rodea o de otras células a través de movimientos iónicos a través de sus membranas, de esta forma los canales son requeridos para distintas funciones básicas como la activación y secreción de linfocinas, mitogénesis, regulación del volumen celular e intervienen en fenómenos como el de la resistencia a diversas drogas (Bertran et al., 1995).

Se ha reportado la expresión de canales de sodio dependientes de voltaje tanto *in vitro* como *in vivo* en diversos carcinomas humanos, incluyendo cáncer de mama (Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003; Gao et al., 2009); cáncer de próstata (Grimes et al., 1995; Laniado et al 1997; Grimes y Djamgoz, 1998; Brackenbury y Djamgoz, 2006), linfoma (Fraser et al, 2004), cáncer pulmonar de células pequeñas (Onganer y Djamgoz, 2005), neuroblastoma (Ou et al., 2005) y cáncer cervico uterino (Díaz et al., 2007).

Un aspecto importante de los canales de sodio dependientes de voltaje en células cancerosas es que se encuentran variantes neonatales/embrionarias obtenidas por el proceso de corte y empalme del ARNm de $Na_v1.5$. Esto ha sido demostrado por la expresión de la subunidad $nNav1.7$ en cáncer de próstata (Diss et al, 2005), la subunidad $nNa_v1.5$ en cáncer de mama (Fraser et al., 2005).

La subunidad alfa de los canales de sodio dependientes de voltaje presenta una sensibilidad particular a la toxina tetrodotoxina (TTX). De tal forma que, TTX es aproximadamente 1000 veces más potente para las subunidades $Na_v1.1-1.4$, $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ (conocidos como canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a TTX) en

comparación con el grupo resistente a TTX ($\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$, $\text{Na}_v1.9$) bloqueados por concentraciones micromolares (μM) de TTX (Diss et al., 2004).

Presencia de canales de sodio dependientes de voltaje in vitro

Mediante técnicas de biología molecular se ha identificado que la isoforma $\text{Nav}1.5$ ($\text{Na}_v1.5$) de la subunidad α de los canales de sodio dependientes de voltaje es la isoforma predominante (>80%) a nivel de ARNm en células de cáncer de mama (Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003; Chioni et al., 2005; Brackenbury et al., 2007).

Existen evidencias de la presencia diferencial de la corriente de sodio (I_{Na}) en líneas celulares de cáncer de mama. Roger et al. 2003 reportó que en una línea tumoral altamente invasiva MDA-MB 231 se presentaba una corriente de sodio (I_{Na}); sin embargo, en una línea celular de cáncer de mama poco invasiva (MCF-7) esta corriente no se presenta. En este mismo estudio, al utilizar un bloqueador de los canales de sodio dependientes de voltaje a altas concentraciones, tetrodotoxina ($30\mu\text{M}$ TTX), se puede observar una disminución aproximadamente del 30% de la actividad invasiva de las células MDA-MB 231; sugiriendo así la participación de los canales de sodio dependientes de voltaje en la regulación de la capacidad invasiva de células tumorales.

Por su parte, Fraser et al. 2005; mediante técnicas de RT-PCR identificó la expresión a nivel de ARNm de las siguientes isoformas de la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje: $\text{Na}_v 1.5$, $\text{Na}_v 1.6$ y $\text{Na}_v 1.7$, predominando las isoformas resistentes a tetrodotoxina; asimismo mediante ensayos de migración celular (ensayos tridimensionales de migración transwell) y utilizando un bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje ($10\mu\text{M}$ TTX) encontraron una disminución aproximadamente del 52% en la migración de la línea celular MDA-MB 231; sugiriendo así la participación de los canales de sodio dependientes de voltaje ($\text{Na}_v 1.5$) en la conducta metastásica de la línea MDA-MB 231.

La toxina TTX no inhibe la proliferación de las células de cáncer sugiriendo que los canales de sodio dependientes de voltaje pueden estar involucrados principalmente en la progresión metastásica, en lugar de tumorigénesis (Brackenbury et al. 2012)

Hay evidencias que sugieren que la isoforma $Na_v1.5$ de la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje tiene un papel fundamental en la conducta invasiva de células de cáncer de mama invasivo. Tal es así que, (Brackenbury et al. 2007) estudió la participación de la subunidad $Na_v1.5$ en una línea celular de cáncer de mama invasivo (MDA-MB 231) para tal efecto, suprimieron la actividad funcional de la subunidad de $Na_v1.5$ mediante dos enfoques experimentales: un ARN de interferencia (siRNA) y un anticuerpo policlonal (NESO-pAb). Para evaluar el efecto de esta modificación 13 días post-transfección emplearon ensayos de expresión génica (PCR en tiempo real), determinaron los niveles de expresión a nivel proteína (Western blot) y ensayos funcionales (registro electrofisiológico *patch-clamp* configuración célula completa, migración e invasión mediante ensayos de transwell). El uso del siRNA redujo los niveles de expresión de $Na_v1.5$ aproximadamente en un 90%, asimismo los niveles de expresión a nivel proteína se redujeron aproximadamente en un 30%. En cuanto a la funcionalidad, el siRNA redujo el pico de la curva de densidad de corriente aproximadamente un 33%; suprimiendo la migración *in vitro* aproximadamente un 43% medido mediante el ensayo de transwell; sugiriendo de esta forma que la presencia de $Na_v1.5$ exacerba la conducta invasiva de células de cáncer de mama.

Presencia de canales de sodio dependientes de in vivo

Ouwerkerk et al. (2007) ha mostrado por imágenes de MRI (MRI: Magnetic Resonance Imaging) que el contenido global de sodio encontrado en lesiones de cáncer mamario maligno fue significativamente mayor que en tejido benigno o en tejido adiposo, lo cual es consistente con la expresión y actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje siendo mayor en el tejido maligno.

La entrada de iones sodio a través de los canales de sodio dependientes de voltaje puede ser fundamentalmente responsable del incremento de la conducta celular metastásica. En la línea tumoral MDA-MB-231 se analizó la curva de activación/inactivación, observaron una corriente de ventana entre potenciales de -60 a -20mV el que podría involucrar que la corriente de sodio se encuentra activa alrededor del potencial de membrana de estas células (aprox. - 40 mV; Roger et al., 2003; Fraser et al., 2005). Resultados comparables fueron obtenidos en una línea celular de pulmón de células no pequeñas (H460), utilizaron una sonda fluorescente específica para el ion sodio (SBFI) estas células mostraron tener

una concentración de sodio intracelular aproximadamente dos veces más grande $[Na^+]_i$ en comparación con células normales de pulmón NL-20 (Roger et al., 2007). Estos resultados concuerdan con el incremento sostenido del ion sodio de tejido de cáncer mamario maligno observado por Ouwerkerk et al. (2007).

Hay experimentos en los cuales han utilizado moléculas reconocidas como bloqueadores de los VGSC que también sugieren un papel de los VGSC en el proceso metastásico a pesar de sus posibles efectos colaterales no específicos de dichos agentes farmacológicos. Tal es el caso del anestésico local lidocaína y el anticonvulsivo fenitoína, ambos inhiben en líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas la actividad endocítica de los VGSC (Onganer y Djamgoz, 2005). Asimismo fenitoína también reduce significativamente la motilidad lateral de células de cáncer de próstata Mat-Lylu (Fraser et al., 2003).

En un estudio realizado por Nelson et al. 2015 evaluó el efecto de fenitoína sobre el crecimiento tumoral y metástasis *in vivo* en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo. En este trabajo, encontraron que tras el tratamiento sistémico con fenitoína (60 mg/Kg ip) la expresión de $Na_v1.5$ redujo el crecimiento del tumor, de la misma forma disminuyó la proliferación, invasión y la metástasis a hígado, pulmón y bazo; con estos hallazgos se corrobora la participación de los VGSC, particularmente que la subunidad $Na_v1.5$ tiene un papel en la progresión del cáncer de mama.

11. Modelo celular de cáncer de mama: Línea celular MDA-MB 231

Uno de los modelos experimentales ampliamente utilizados en la investigación de la biología del cáncer de mama es el uso de líneas celulares, cuyo objetivo es el conocer los genes blanco y mecanismos moleculares que regulan los procesos de proliferación, apoptosis y migración celular durante el desarrollo del cáncer mamario.

Nosotros decidimos emplear como modelo celular de cáncer de mama triple negativo, la línea celular MDA-MB 231 que se caracteriza por ser negativa al receptor de estrógenos, progesterona y expresa niveles negligibles de HER-2; de esta forma provee un modelo de cáncer mamario triple negativo.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama ocupa el primer lugar de incidencia en las mujeres adultas a nivel mundial, siendo la metástasis la principal causa de muerte. Evidencias epidemiológicas y clínicas consideran a la obesidad como uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo y progresión del cáncer de mama. La condición de obesidad se caracteriza por presentar altos niveles séricos de adipocinas, destacándose entre ellas leptina.

La capacidad metastásica de las células tumorales involucra que éstas adquieran e incrementen tanto su capacidad migratoria como su capacidad proliferativa. Estudios previos realizados en diferentes líneas tumorales han asociado la capacidad metastásica de las células con la sobre-expresión funcional de algunas proteínas de membrana, tales como canales iónicos dependientes de voltaje e intercambiadores iónicos, ya que al bloquear la expresión o actividad de estas proteínas de membrana, se afecta negativamente la capacidad migratoria de las células.

Considerando a la obesidad como factor de riesgo para el cáncer de mama, resulta prioritario conocer el mecanismo molecular a través del cual, las adipocinas estimulan la capacidad metastásica, para de esta manera poder proponer blancos farmacológicos que inhiban la incidencia de muerte provocada por metástasis del cáncer de mama.

HIPÓTESIS

Leptina exacerba la capacidad metastásica de las células MDA-MB 231, específicamente estimulando la capacidad migratoria y proliferativa de células tumorales, efecto mediado por la expresión de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje $\text{Na}_v 1.5$ y el intercambiador Na^+/H^+ , isoforma NHE1.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo molecular a través del cual, la activación del receptor a leptina estimula la capacidad migratoria y la capacidad proliferativa de la línea tumoral MDA-MB 231

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de leptina sobre la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria en las células MDA-MB-231
2. Detectar la expresión del receptor a leptina en las células MDA-MB-231
3. Definir si el efecto de leptina sobre la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria de células MDA-MB-231 depende tanto de la concentración como de la duración del tratamiento.
4. Determinar si la presencia de leptina regula los niveles de expresión del ARNm que codifica para la subunidad α del canal de sodio Na_v 1.5 y del intercambiador NHE1, e investigar si el efecto depende tanto de la concentración de la hormona como de la duración del tratamiento.
5. Evaluar si la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 es mediada por la expresión funcional de la subunidad α del canal de sodio Na_v 1.5.

METODOLOGÍA

1. Cultivo y mantenimiento de la línea celular MDA-MB-231

Las células MDA-MB 231, provienen de un adenocarcinoma de mama obtenidas a partir del líquido pleural. Son células agresivas, poseen un fenotipo invasivo y altamente metastásico. En los cultivos celulares estándar se observa la formación de una monocapa no organizada debido a que las células no forman uniones intercelulares. Su morfología celular es de tipo mesénquimal, por ello, los cultivos confluentes no rebasan los $5-6 \times 10^6$ células en una superficie de 80 cm^2 .

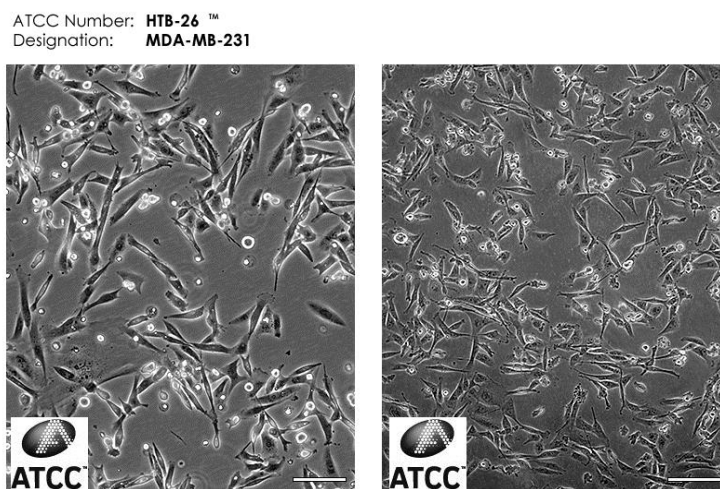


Figura X. Morfología celular de la línea tumoral MDA-MB-231.
Las microfotografías nos muestran la morfología mesenquimal de las células MDA-MB-231 las cuales presentan una confluencia diferencial a) baja densidad b) alta densidad

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en matraces de poliestireno de 25 cm^2 de superficie con medio de cultivo Advanced DMEM, suplementado al 3% con Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de L-Glutamina, 1% de mezcla de antimicótico-antibiótico. Las células se mantienen en una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% aire.

El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas. Cuando las células llegan a una confluencia aproximada de 90%, se someten a tripsinización. Este proceso consiste en colocar solución de tripsina al 0.25% disuelta en 453 mM de EDTA, posteriormente se adiciona medio de cultivo y se realiza una disgregación celular mecánica, la suspensión celular se coloca en un tubo cónico y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, se

elimina el sobrenadante, mientras que la pastilla celular se resuspende en medio de cultivo fresco, a partir del cual se toman alícuotas para regenerar el medio de cultivo madre y sembrar placas para cada uno de los experimentos programados.

2. Tratamiento de la línea celular MDA-MB-231

La hormona leptina ejerce su función a través de la unión a su receptor específico (ObR) presente en la membrana celular. Para determinar el efecto de esta hormona sobre la capacidad migratoria y la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231, se mantuvieron en la presencia de leptina recombinante humana (Preprotech, USA) a diferentes concentraciones. La toxina Tetrodotoxina (T8024-Sigma) es un bloqueador selectivo de los canales de sodio dependientes de voltaje, fue utilizada para estudiar el papel de los canales de sodio dependientes de voltaje en la migración celular. Se empleó una concentración de 10 μ M para estudiar el bloqueo de la migración celular mediada por leptina.

3. Ensayos de RT-PCR

Esta técnica consta de 4 pasos, extracción de ARN total y posterior cuantificación; segundo paso, síntesis de ADNc a partir del ARN total extraído (transcripción reversa); tercer paso, amplificación del ADNc (reacción en cadena de la polimerasa); y cuarto paso, separación electroforética de los amplicones y análisis densitométrico.

a. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de las células MDA-MB-231 se llevó a cabo mediante un kit comercial Quick RNA™ Mini-Prep de Zymo Research. El principio de extracción de ARN total por este método se fundamenta en fenómenos de adsorción reversible de ácidos nucleicos a una membrana de sílica especialmente tratada para este fin en presencia de una alta concentración de agentes caotrópicos. Para realizar este ensayo, las células MDA-MB-231 se sembraron en placas de seis pozos. Al término del periodo de incubación se llevó cabo el siguiente procedimiento.

La monocapa de células MDA-MB-231 se incubó con el buffer de lisis (cuya composición es principalmente enzimas líticas y una alta concentración de agentes caotrópicos), éste buffer se caracteriza por inactivar de forma inmediata las RNasas, generando de esta forma las condiciones idóneas para la unión de ácidos nucleicos a la membrana de sílica

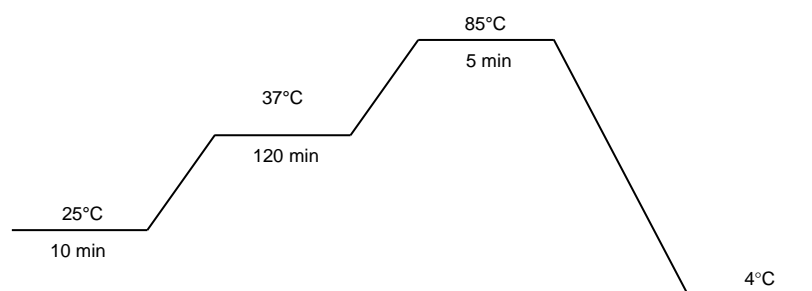
de la columna. Posteriormente para la clarificación, el lisado celular se colocó en una columna de filtración para homogeneizarlo y reducir su viscosidad, favoreciendo su paso a través de la columna de unión de ácidos nucleicos. El ADN contaminante así como sales, metabolitos y macro-componentes celulares son eliminados mediante sucesivos lavados de la columna con dos soluciones buffer de lavado (Buffer de pre-lavado y buffer de lavado) y posterior centrifugación (12, 000 rpm). Finalmente, el ARN es eluído de la columna utilizando agua libre de RNasas. De esta forma, una vez eluído el ARN debe de tratarse con el máximo cuidado ya que el ARN es muy sensible a cualquier traza de RNasas presentes en el ambiente o material de trabajo; por lo cual debe mantenerse congelado a -20°C para periodos cortos o a -70°C para periodos largos de almacenamiento.

b. Determinación de concentración y pureza del ARN

La cuantificación de la concentración se fundamenta en la capacidad de los ácidos nucleicos para absorber la luz ultravioleta a longitudes de onda específicas. La absorbancia máxima de soluciones de ARN es 260nm y para soluciones de proteínas absorben a 280nm. De esta forma, la estimación del cociente 260/280 nos proporciona una estimación del grado de pureza del ARN. Para conocer la concentración y calidad (grado de pureza) del ARN, se preparó una solución 1:50 del ARN de la línea celular MDA-MB-231. Se midió mediante espectrofotometría el cociente 260/280 y la concentración ($\mu\text{g/mL}$) (Eppendorf Biophotometer).

c. Síntesis de ADNc – Transcripción reversa (RT)

La retrotranscripción es el proceso mediante el cual el ARN mensajero (ARNm) se transforma en ADN complementario (ADNc) gracias a la acción de la enzima transcriptasa reversa. El ADNc obtenido es de doble cadena y más estable que el RNA molde. Para realizar la síntesis del ADNc se llevó a cabo con $2\mu\text{g}$ de ARN procedente de las células MDA-MB-231 utilizando un kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante. El proceso se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf) bajo las siguientes condiciones:

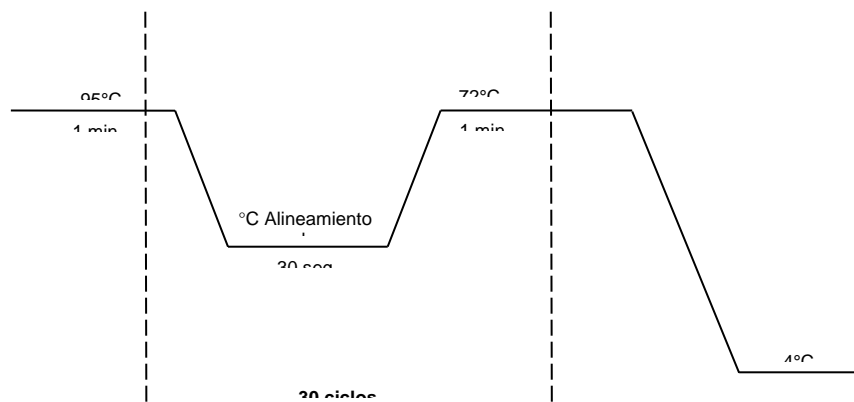


d. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica empleada para amplificar una secuencia de ADN, generando cientos de millones de copias. Se emplea la enzima termoestable Taq polimerasa y una cadena de ADN simple como molde.

La mezcla de reacción se realizó mediante el kit Dream Taq PCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific cuyos componentes son: dNTPs, enzima Taq polimerasa, MgCl₂ y una solución buffer. A esta mezcla se adicionaron los oligonucleótidos sentido y antisentido para la amplificación específica. La secuencia de los oligonucleótidos empleados; así como las condiciones de los ciclos térmicos.

Oligonucleótido	Secuencia	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño (pb)
ObR	Fwd:CATTTTATCCCCATTGAGAAGTA Rev:CTGAAAATTAAGTCCTTGTGCCCA	63.7	270
Na _v 1.5	Fwd: ACGGCACCTCTGATGTGTTACTGT Rev: TGAGGGCCTCGTGTTCCTTTCTTGA	60.2	393
Na _v 1.7	Fwd:TCCTCAGAGTGCGAGCACAGTTGAT Rev: AACCGTGACCCATCTGTGGTGTTA	60.3	797
NHE1	Fwd: TCTCTTCCCACTTGCTGACCCTTT Rev: AACCTATCTTCATGAGGCAGGCCA	60.2	443
β-actina	Fwd:CAAGACCTGTACGCCAACAC Rev:CATACTCCTGCTTGCTGATCC	64	218



e. Separación electroforética de los amplicones y análisis densitométrico

La separación de los productos obtenidos (amplicones) se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2% disuelto en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA), se adicionan 4 μ L de bromuro de etidio para tener una concentración final de 0.8 μ g/mL. Las condiciones para la corrida electroforética son 65V durante 80 minutos. La imagen se obtiene mediante un documentador de geles (ChemiDoc, Bio-Rad). La densitometría de las bandas se realiza mediante el software ImageJ.

4. Ensayos de migración celular

a. Ensayo de cierre de herida

Esta técnica tiene como objetivo evaluar la migración celular lateral colectiva de células, se evalúa generando espacios vacíos (heridas) sobre una capa de células, donde la dinámica de cierre de herida pueden ser evaluada. El ensayo involucra el cultivo de una monocapa confluyente de células MDA-MB-231, a la cual se le realiza una herida o abertura a lo largo de la monocapa con el uso de una punta estéril de micropipeta, dando lugar a la destrucción de un grupo de células.

Después de 48h iniciado el tratamiento, las células fueron teñidas con cristal violeta para visualizar y evaluar la migración. Por cada pozo, se tomaron cuatro fotografías de regiones al azar, utilizando el objetivo 4X para una mejor visualización de la herida. Para analizar el área que queda sin cerrar, se utiliza la herramienta *MRI Wound Healing Tool* para el software *ImageJ*, la cual nos permite delimitar los bordes de la herida y realizar un análisis automático de ésta.

b. Ensayo de migración transwell

El principio de este ensayo se basa en la presencia de dos cámaras con medio, una superior (células son sembradas) y una inferior medio con agente quimio-atrayente, que se encuentran separadas por una membrana porosa a través de la cual las células pueden migrar.

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, cuando alcanzaron una confluencia aproximada del 50-60% se comenzó el tratamiento con leptina 50 y

200nM durante 48 horas. Se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS, se adicionaron 500 µl de tripsinay se incubaron por 5 minutos, para inactivar a la enzima se agregaron 900 µL de medio libre de suero y se resuspendió, obteniendo como volumen final 1400 µL. Del volumen total se tomaron 400 µl para realizar el conteo celular (células/mL) mediante el contador automático Scepter 2.0, esto se realizó para cada condición.

El ensayo de migración se realizó en placas de 24 pozos con las cámaras Transwell que contiene insertos de policarbonato con poros de 8µm. Al compartimento superior se agregaron 30 000 células; mientras tanto al compartimento inferior se agregaron 750 µl de medio Advanced-RPMI suplementado al 3% con SFB, como quimio-atrayente. Después de 12 h de incubación a 37°C, los insertos fueron removidos y con ayuda de un hisopo se removieron las células que no lograron migrar a través de los poros desde el compartimento superior. Las células que migraron a través de la membrana se fijaron con 1 ml de Acetona-Metanol durante 20 minutos, posteriormente se tiñeron con 1 ml de cristal violeta durante 20 minutos, enseguida se realizaron 4 lavados con agua desionizada para retirar el exceso de colorante y fueron contadas usadas contadas usando un microscopio de campo claro.

Se tomaron 4 imágenes por pozo (4X) y el conteo de las células que migraron se realizó mediante el software Image J

5. Ensayos de proliferación celular

a. Determinación de proteínas totales

Para realizar la cuantificación de proteínas, se utilizó el Kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Este método combina la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por las proteínas en un medio alcalino (reacción de biuret) con la detección colorimétrica y altamente sensible del catión cuproso (Cu^{+1}) utilizando un reactivo único que contiene ácido bicinónico. siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Para lo cual, se preparó una curva de calibración con una serie de diluciones de BSA, como proteína de referencia. La solución de trabajo se prepara colocando 50 partes de la Solución A y 1 parte de la Solución B. Para cada una de las muestras problema como a cada concentración para la curva de calibración, se colocaron 500µL de la solución de trabajo y 50µL de la muestra de proteína problema o en su caso de BSA.

b. Citómetro de flujo portátil

Se realizaron curvas de crecimiento para las células de la línea tumoral MDA-MB 231 para determinar la fase de crecimiento exponencial y evaluar proliferación celular. Las células fueron sembradas en cajas Petri de 35mm, la densidad celular inicial (0h) fue de 30, 000 células para cada uno de los tiempos indicados (24, 48, 72, 96, 120, 144 horas), al término de cada periodo de incubación se realizó el conteo celular mediante un citómetro de flujo portátil (Scepter 2.0).

Para evaluar la proliferación celular en la fase exponencial de la línea tumoral MDA-MB 231. Se sembraron placas de 6 pozos, para cada condición se sembraron 3×10^5 células. El inicio del tratamiento con leptina se realizó a las 24 horas posteriores al sembrado de las células durante un periodo de 48 horas, finalizando a las 72 horas posteriores al sembrado y finalizado el periodo de incubación (48 h), se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Se agregaron 500 μ l de tripsina (Life Technologies) durante 10 minutos, posteriormente agregamos 1000 μ l de PBS y la suspensión celular fue resuspendida; inmediatamente después se realizó el conteo (número de células/ml).

6. Inmunocitoquímica

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, cuando alcanzaron una confluencia aproximada del 40%. Se realizaron lavados con PBS y se fijaron con un buffer de fijación (PIPES, HEPES, EGTA, $MgSO_4$, paraformaldehído PFA, KOH).

Las células fueron permeabilizadas con solución NP-40 0.25%. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó incubando 30 minutos con H_2O_2 . Se realizaron lavados con buffer PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con Solución de Bloqueo (Gelatina 0.5%, SFB 1.5% en PBS) durante 2 horas. Para evaluar la expresión del receptor a leptina (Ob-R), las células fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo primario que reconoce el receptor a leptina a una dilución 1:100 (Santa Cruz Biotechnology), posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a biotina a una dilución 1:200 (Santa Cruz Biotechnology). Se adicionó el complejo Avidina-HRP (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:500 en PBS dejándose incubar durante 30 minutos.

Posteriormente se adicionó el sustrato para HRP (EAC kit Staining, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. La reacción enzimática fue detenida con agua para posteriormente ser observadas en el microscopio de campo claro (Leica 2000) se tomaron 5 fotografías por pozo.

7. Inmunofluorescencia

Las células MDA-MB 231 fueron sembradas en cubreobjetos, cuando alcanzaron una confluencia aproximada del 40%, se realizaron lavados con PBS y se fijaron con un buffer de fijación (PIPES, HEPES, EGTA, MgSO₄, Paraformaldehído PFA 3.7%, KOH).

Las células fueron permeabilizadas con solución Tritón X-100 al 0.10%. Se realizaron lavados con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con Solución de Bloqueo (Gelatina 0.5%, SFB 1.5% en PBS) durante 2 horas. Para evaluar la expresión de la subunidad α del canal de sodio Nav1.5, las células fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpo primario a una dilución 1:200 (Santa Cruz Biotechnology), posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 647 a una dilución 1:500 (Invitrogen) por dos horas, se lavaron las células y se tiñó el núcleo con la solución Hoechst H6024 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.5 μ g/mL. Se realizaron lavados con PBS y se montaron los cubreobjetos en medio VectaShield H-100 (Vector) en un portaobjetos. Posteriormente las muestras se examinaron con un microscopio confocal (Nikon).

8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y gráficos se utilizó el programa Sigma Plot 11.0. Los datos obtenidos se presentan como el promedio \pm error estándar de la media. Para evaluar el efecto de leptina sobre la capacidad migratoria en ensayo de herida se empleó la prueba estadística *t- de Student* no pareada. Para evaluar el efecto de leptina sobre la proliferación celular mediante cuantificación de proteínas se utilizó ANOVA de dos vías. En el análisis del efecto de leptina sobre la proliferación celular mediante conteo celular, curvas dosis-respuesta, migración en cámaras de transwell se utilizó ANOVA de una vía. Se consideró diferencia significativa el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Las células MDA-MB 231 expresan el receptor a leptina.

Inicialmente decidimos investigar si nuestro modelo experimental, la línea celular MDA-MB-231, expresa el ARNm que codifica para el receptor de leptina (Ob-R). La separación electroforética de los productos de PCR muestra claramente una banda de 270 pb, que corresponde a la secuencia esperada del receptor a leptina, en función de los oligonucleótidos diseñados (Figura I). La presencia del ARNm que codifica para el receptor a leptina se correlaciona perfectamente con la expresión de la proteína (Figura II).

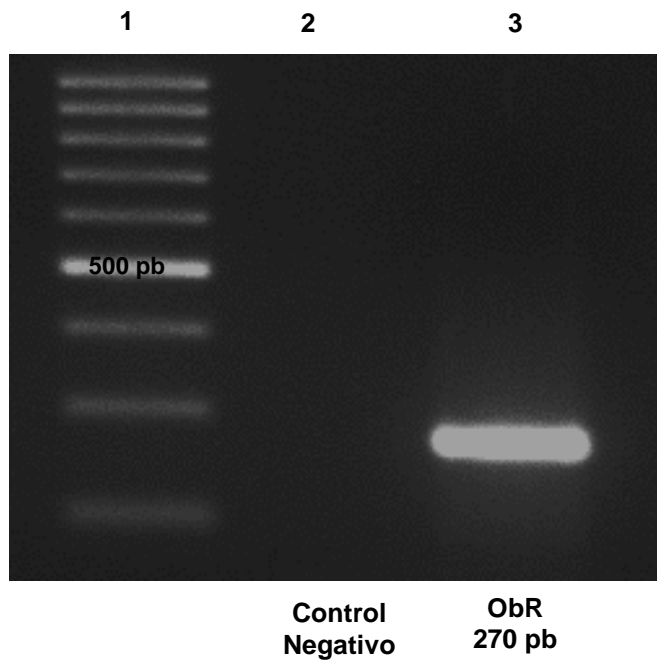


Fig. I Expresión a nivel de ARNm que codifica para el receptor a leptina (Ob-R) en la línea tumoral MDA-MB-231. Se realizó extracción de ARN de las células MDA-MB-231, seguidas de reacción de transcripción reversa y posteriormente reacción en cadena de la polimerasa. En el carril 1, se ubica el marcador de peso molecular. En el carril 2, se encuentra el control negativo. En el carril 3, se observa el ARNm que codifica para ObR con una extensión de 270 pb.

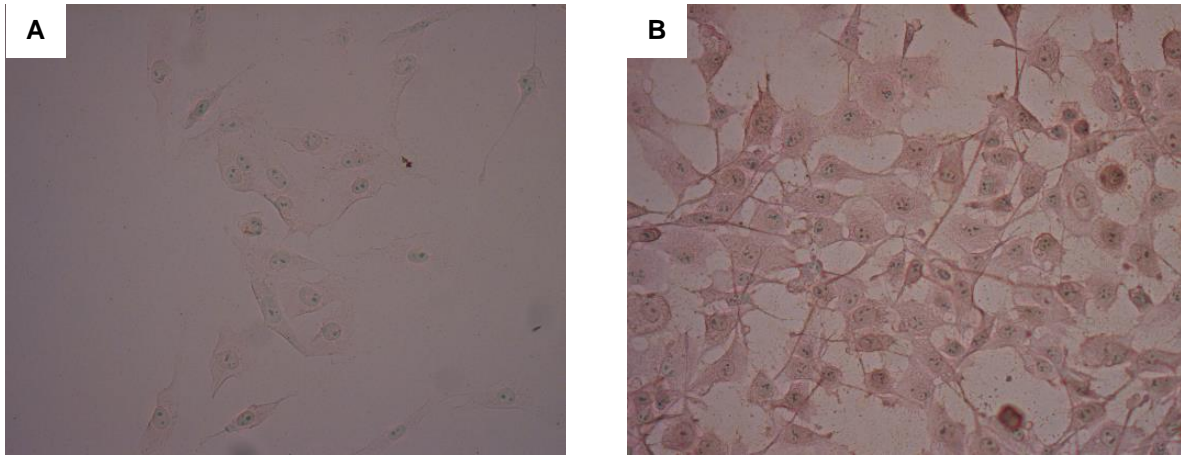
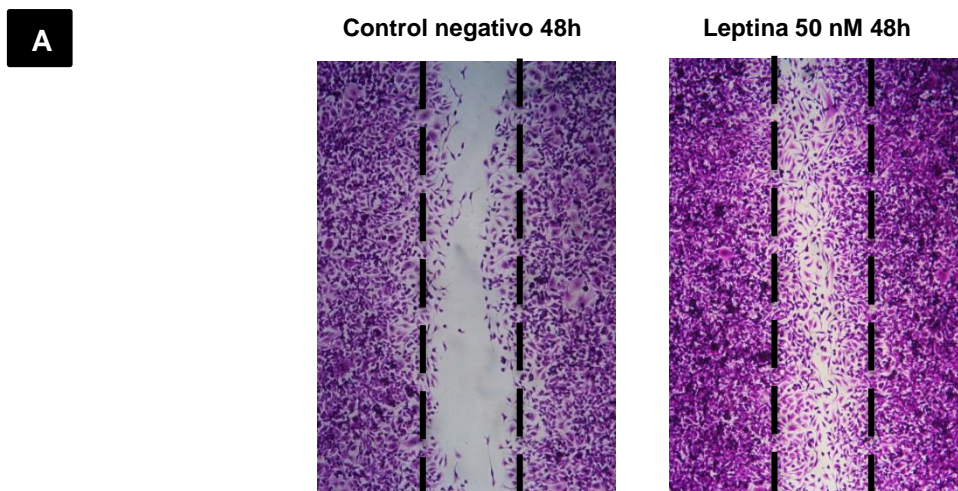


Figura II. Expresión del receptor a leptina (ObR) a nivel de proteína en la línea tumoral MDA-MB-231. A) Células MDA-MB-231 en condiciones control, fueron incubadas en ausencia del anticuerpo primario anti-ObR B) Células MDA-MB-231 en condiciones control incubado con anticuerpo primario dirigido contra el receptor de leptina ObR. Condición experimental control: Sin tratamiento

Leptina estimula la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 sin afectar su capacidad proliferativa.

Con el objetivo de evaluar si la leptina ejerce un efecto sobre la migración y proliferación de la línea celular MDA-MB-231, realizamos una serie de experimentos preliminares que nos permitió evaluar ambas capacidades. En primer lugar, realizamos un ensayo de cierre de herida para evaluar migración celular, para lo cual utilizamos una concentración única de leptina (50 nM) durante 48h. En la Fig. IIIA se puede observar como la presencia de leptina estimula significativamente la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Evaluando el área de cierre de la herida, tenemos que leptina la reduce en promedio 23.8 ± 1.5 % con respecto a la condición control (Figura IIIB).



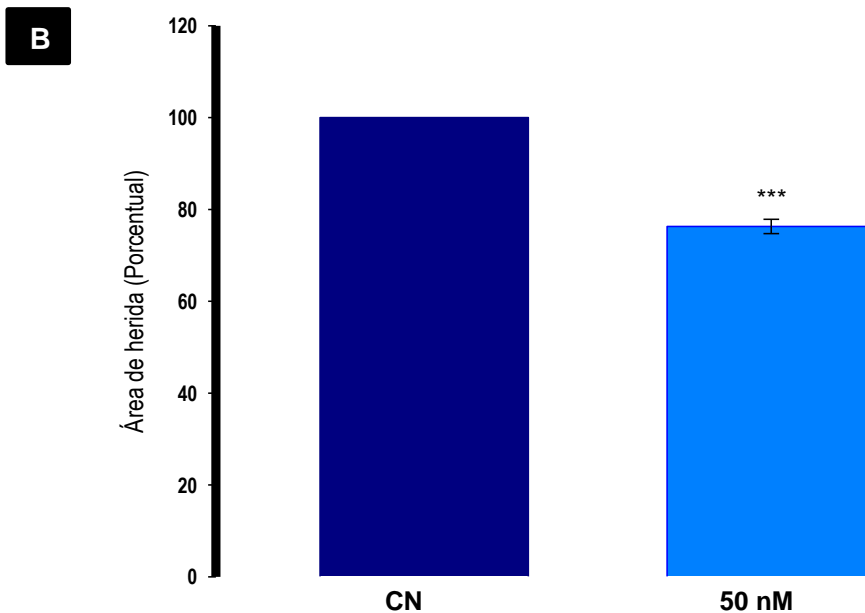


Fig. III Efecto de leptina sobre la capacidad migratoria en células MDA-MB-231

a) Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos y tratadas con leptina 50 nM durante 48h. Cuando alcanzan una confluencia aproximada del 90-100%. Con una punta micropipeta se realizó una herida a lo largo del pozo. Se inició el tratamiento de las células MDA-MB-231 con leptina 50nM; después de 12h iniciado el tratamiento las células fueron teñidas con cristal violeta. b) El análisis cuantitativo del área de herida se realizó con el software ImageJ. El valor del control fue considerado el 100% de expresión y cada condición fue relacionada con este valor para calcular el porcentaje respectivo. Los valores se presentan como el media \pm error estándar de tres experimentos independientes (n=3) ***p<0.001

El cambio observado en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 en presencia de leptina, pudiera ser explicado también por un cambio en la capacidad proliferativa de las células, y lo que estamos observando en el área de la herida no son células que migran, sino células nuevas, con el fin de resolver este cuestionamiento, decidimos evaluar la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231 en presencia de leptina, lo cual se realizó cuantificando la cantidad de proteínas totales como una medición indirecta de la proliferación celular. El tratamiento con leptina a diferentes tiempos (24, 48 y 72h) y concentraciones (10, 50, 200 nM) no produce un efecto significativo sobre la proliferación celular (Figura IV).

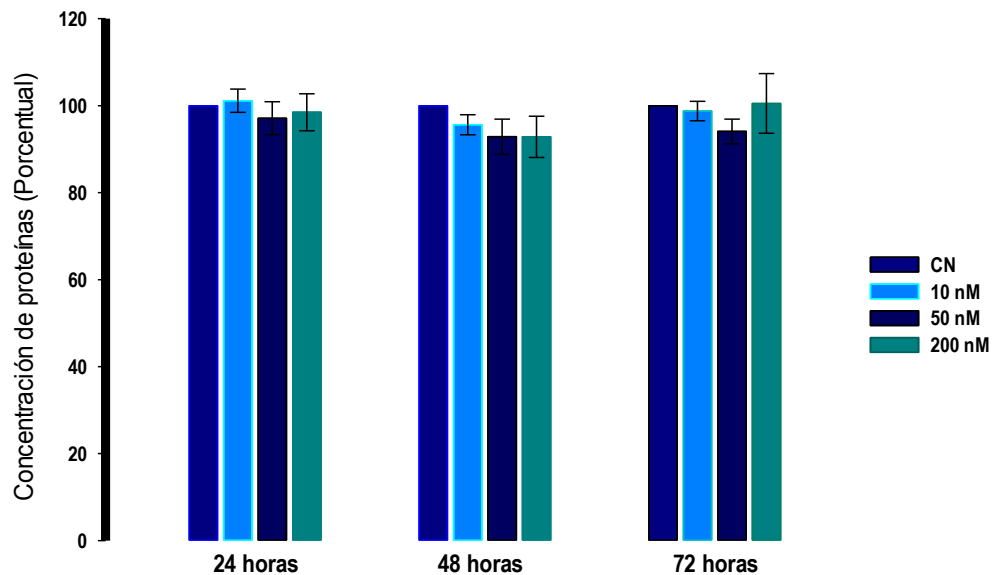


Figura IV. Leptina no produce cambios sobre la proliferación celular en la línea tumoral MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 fueron estimuladas con dosis crecientes de leptina (10, 50, 20 nM) a diferentes tiempos de incubación (24, 48, 72h), al término del tiempo de incubación se realizó extracción y cuantificación de proteínas totales (método BCA). Los datos mostrados se encuentran normalizados contra su propio control. El valor del control fue considerado el 100% de proliferación celular y cada condición fue relacionada con este valor para calcular el porcentaje respectivo. Los valores se presentan como el media \pm error estándar de tres experimentos independientes en cada condición (n=3)

Leptina estimula la expresión del ARNm que codifica para la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje $Na_v1.5$ en células MDA-MB 231.

Es un hecho que la leptina modifica la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, pero desconocemos los elementos moleculares que están participando en dicho proceso. Información previa recabada en otros modelos tumorales, resaltan la participación de canales de sodio dependientes de voltaje y del intercambiado Na^+/H^+ en la capacidad migratoria de las células. Decidimos detectar la presencia del ARNm que codifica para la subunidad alfa del canal de sodio $Na_v1.5$ y $Na_v1.7$ en la línea tumoral MDA-MB 231, ya que estas isoformas de canal de sodio han sido reportadas en cáncer de mama y cáncer de próstata. Ensayos de RT-PCR muestran que las células MDA-MB-231 solamente expresan el ARNm que codifica para la isoforma $Na_v1.5$ (FV).

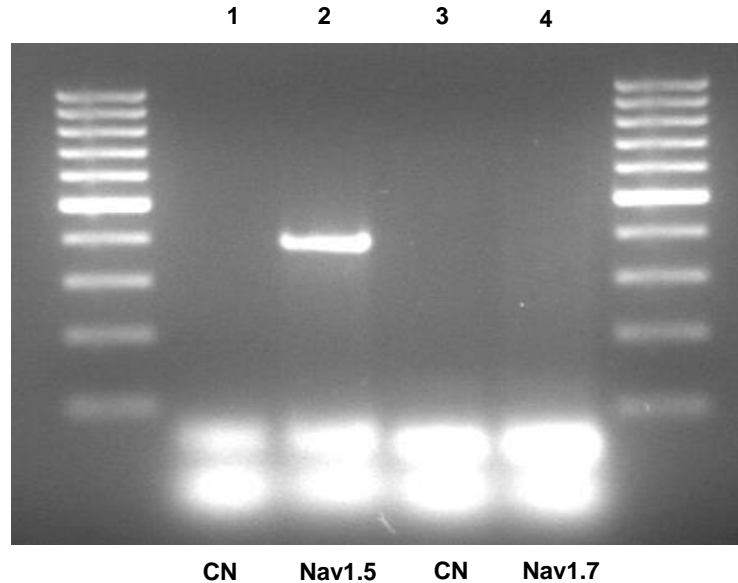


Fig. V Expresión a nivel de ARNm de la isoforma $Na_v1.5$ y $Na_v1.7$ de la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje en la línea tumoral MDA-MB 231. Se realizó extracción de ARN de la célula MDA-MB 231, seguida de reacción de transcripción reversa y posteriormente reacción en cadena de la polimerasa. En el carril 1, se ubica el Control Negativo (CN) de la isoforma $Na_v1.5$. En el carril 2, se encuentra el ARNm que codifica para la isoforma Nav1.5 del canal de sodio dependiente de voltaje, la extensión del amplicón es de 393 pb. En el carril 3, se ubica el Control Negativo (CN) de la isoforma $Na_v1.7$. En el carril 4, no se presenta la banda correspondiente al ARNm que codifica para la isoforma Nav1.7.

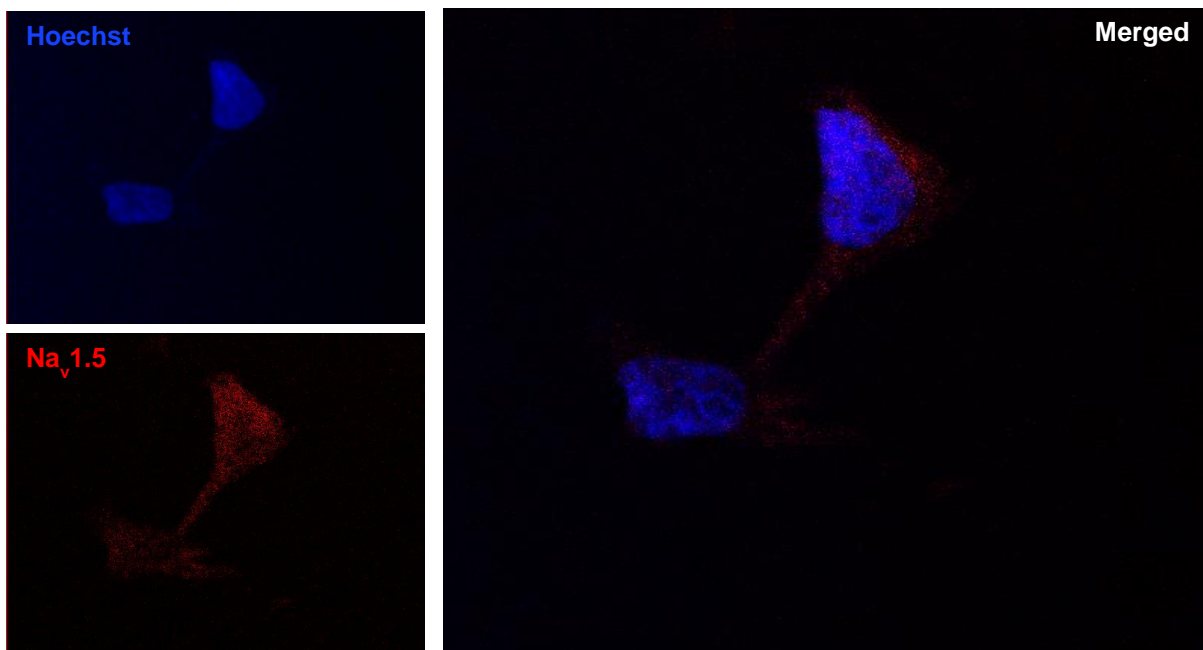


Figura VI. Expresión a nivel proteína de la isoforma $Na_v1.5$ de la subunidad del canal de sodio dependiente de voltaje en la línea tumoral MDA-MB 231. En condiciones basales las células MDA-MB 231 fueron sembradas en cubreobjetos, fijadas y teñidas para microscopia utilizando el anticuerpo monoclonal primario anti- $\alpha1.5$ y anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 647 (color rojo) y contrateñidas con Hoechst. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopia confocal con aumento 40X.

A continuación investigamos si la presencia de leptina modifica los niveles de expresión del ARNm que codifica para la subunidad α del canal de sodio $\text{Na}_v1.5$. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con leptina a una concentración de 50nM por un periodo de 24 y 48 horas. Una vez finalizado el periodo de tratamiento, evaluamos por RT-PCR el nivel de expresión del ARNm para $\text{Na}_v 1.5$ (Figura VIIA), observando que leptina induce un incremento significativo en el ARNm que codifica para $\text{Na}_v 1.5$ de 119.4 ± 6.9 a las 24 de tratamiento y 139.1 ± 8.6 a las 48 horas (Figura VIIB). Un experimento preliminar que no se presenta fue realizado a las 12 horas de tratamiento con leptina 50 nM, en el cual no se observó un cambio significativo en el ARNm para $\text{Na}_v 1.5$, esto sugiere la necesidad de incubar las células por un periodo mínimo de 24 horas para observar un cambio significativo, y que puede estar involucrado un mecanismo genómico.

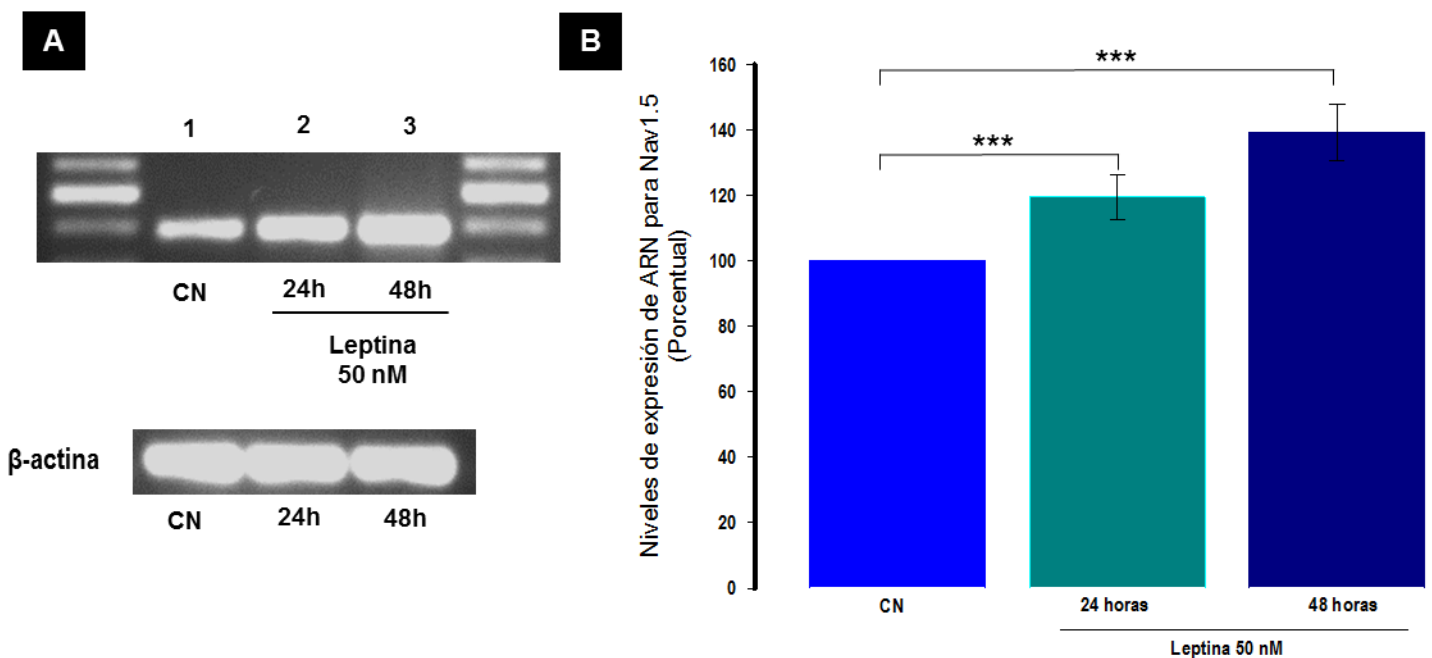


Fig. VII Leptina estimula la expresión a nivel de ARNm de la isoforma $\text{Na}_v1.5$ de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje en la línea tumoral MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con una concentración de 50nM de leptina durante 24 y 48 horas, posteriormente se realizó extracción de ARN, transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa y posterior separación electroforética para la detección de $\text{Na}_v1.5$. **A)** En el carril 1, corresponde a la condición control (sin tratamiento). En el carril 2 y 3, se observa la expresión a nivel de ARNm de la isoforma $\text{Na}_v1.5$ del canal de sodio dependiente de voltaje, después de 24 y 48 horas de incubación con leptina 50 nM. La extensión del amplicón corresponde a 393 pb. **B)** Los datos de la gráfica se obtuvieron por densitometría de cada una de las condiciones y normalizadas con el valor de β -actina. El valor del control fue considerado el 100% de expresión y cada condición fue relacionada con este valor para calcular el porcentaje respectivo. Los valores se presentan como el media \pm error estándar de cinco experimentos independientes (n=5) en cada condición. ***p<0.001

El efecto observado de leptina sobre el nivel de expresión del ARNm para Nav 1.5 es dosis-dependiente, ya que es necesaria una concentración mínima de 50 nM de leptina por 48 horas para observar un incremento significativo (135.7 ± 5.7) con respecto a la condición control (Figura VIII)

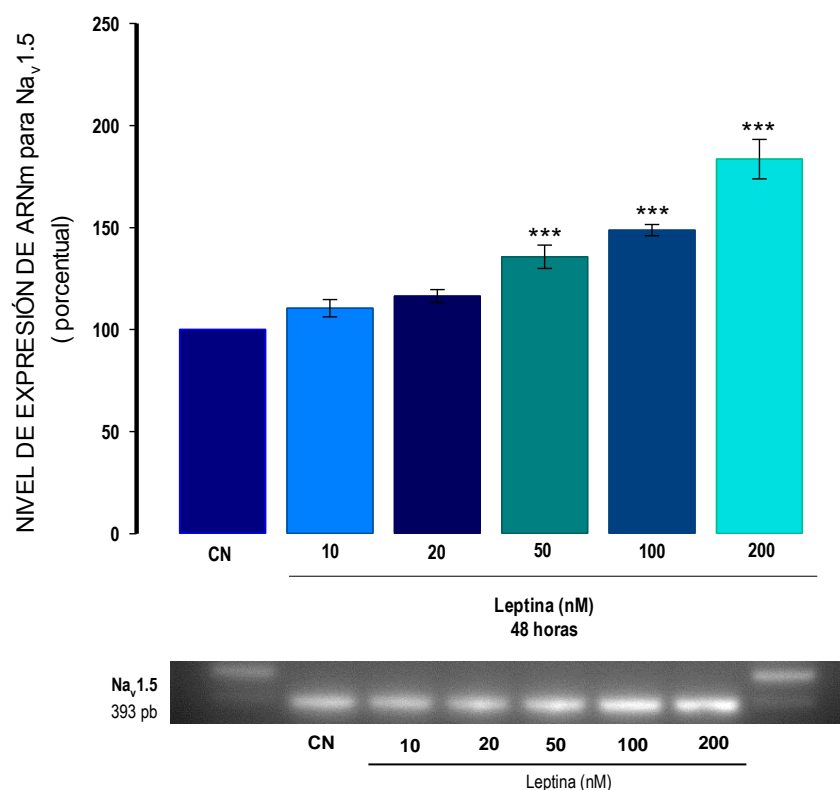


Figura VIII. Curva dosis-efecto de leptina sobre la expresión de la isoforma Nav_v 1.5 de la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje en la línea tumoral MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 fueron estimuladas con dosis crecientes de la adipocina leptina (10, 20, 50, 100, 200 nM) durante 48 horas de incubación. Se realizó extracción de ARN de células MDA-MB-231 y mediante la técnica de RT-PCR se evaluó la expresión de la isoforma Nav1.5, cuya extensión es de 393 pb. Los niveles de expresión se encuentran normalizados con el valor del control interno β -actina. Los datos de la gráfica se obtuvieron por densitometría de cada una de las condiciones y normalizadas con el valor de β -actina. El valor del control fue considerado el 100% de expresión y cada condición fue relacionada con este valor para calcular el porcentaje respectivo. Los valores se presentan como el media \pm error estándar de cinco experimentos independientes (n=5) en cada condición. ***p<0.001

La expresión del ARNm que codifica para el intercambiador Na^+/H^+ , isoforma (NHE-1) en la línea tumoral MDA-MB-231 es estimulada por la presencia de leptina.

Algunos autores han descrito la participación positiva del intercambiador Na^+/H^+ , específicamente la isoforma NHE1, en la capacidad migratoria de células tumorales, incluyendo las células de carcinoma de mama humano (Reshkin et al., 2000). En el mismo sentido, Onishi y colaboradores (2012), evidenciaron que la sobreexpresión del intercambiador NHE1 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 exacerba su capacidad invasiva.

En nuestro modelo experimental, evaluamos si el tratamiento con leptina modifica los niveles de expresión del ARNm que codifica para la isoforma NHE1 y si el efecto es dependiente de la duración del tratamiento así como de la concentración de leptina. Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con una dosis única de leptina 50 nM por un periodo de 24 y 48 horas. Después del periodo de incubación, se realizaron ensayos de RT-PCR, observándose que leptina induce un incremento significativo en los niveles de ARNm que codifica para NHE1 a partir de las 24 horas de tratamiento (106 ± 2.1), acentuándose el efecto a las 48 horas (125 ± 3), con respecto a la condición control (Fig IX).

De manera complementaria, analizamos si el efecto de leptina sobre la expresión del intercambiador NHE1 depende de la concentración de hormona empleada. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con dosis crecientes de leptina (10, 20, 50, 100, 200 nM) por 48 horas. Al realizar la curva dosis-efecto se observa claramente que la concentración mínima para incrementar significativamente los niveles de ARNm del intercambiador NHE1 es 50nM (124.9 ± 3.1), y conforme aumenta la concentración de la adipocina, se observa un incremento proporcional en los niveles del ARNm para NHE1, por ejemplo, a la concentración máxima de leptina que empleamos, 200 nM, se presenta un incremento de casi tres veces (278.1 ± 29.6) con respecto a la condición control (Fig. X).

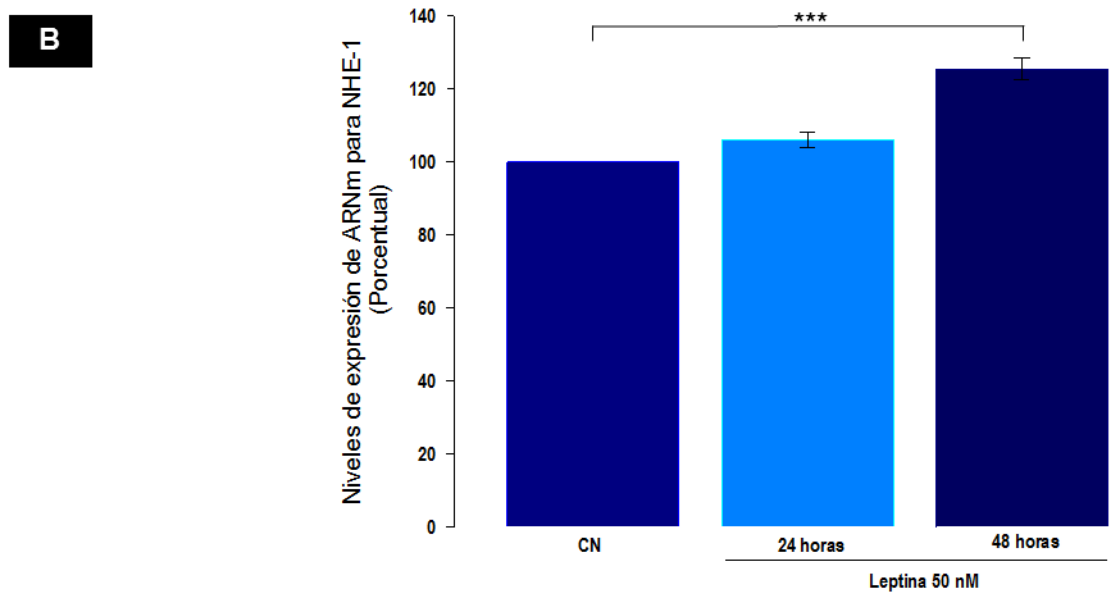
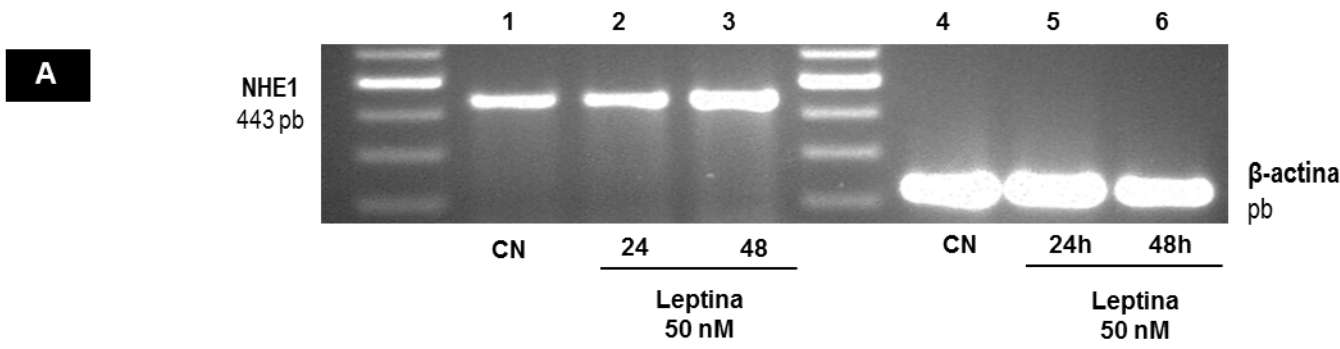


Fig. IX Leptina estimula la expresión a nivel de ARNm de la isoforma NHE1 del intercambiador Na⁺/H⁺ en la línea tumoral MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con una concentración de 50nM de leptina durante 24 y 48 horas, posteriormente se realizó extracción de ARN, transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa y posterior separación electroforética para la detección de NHE1 **A)** En el carril 1, corresponde a la condición control (sin tratamiento). En el carril 2 y 3, se observa la expresión a nivel de ARNm de la isoforma NHE1 del intercambiador Na⁺/H⁺. El carril 4, 5, 6 corresponde a β-actina con las mismas condiciones experimentales. La extensión del amplicón corresponde a 443 pb para NHE1 y pb para β-actina. **B)** Los datos de la gráfica se obtuvieron por densitometría de cada una de las condiciones y normalizadas con el valor de β-actina. El valor del control fue considerado el 100% de expresión y cada condición fue relacionada con este valor para calcular el porcentaje respectivo. Los valores se presentan como el media ± error estándar de cinco experimentos independientes (n=5) en cada condición. ***p<0.001

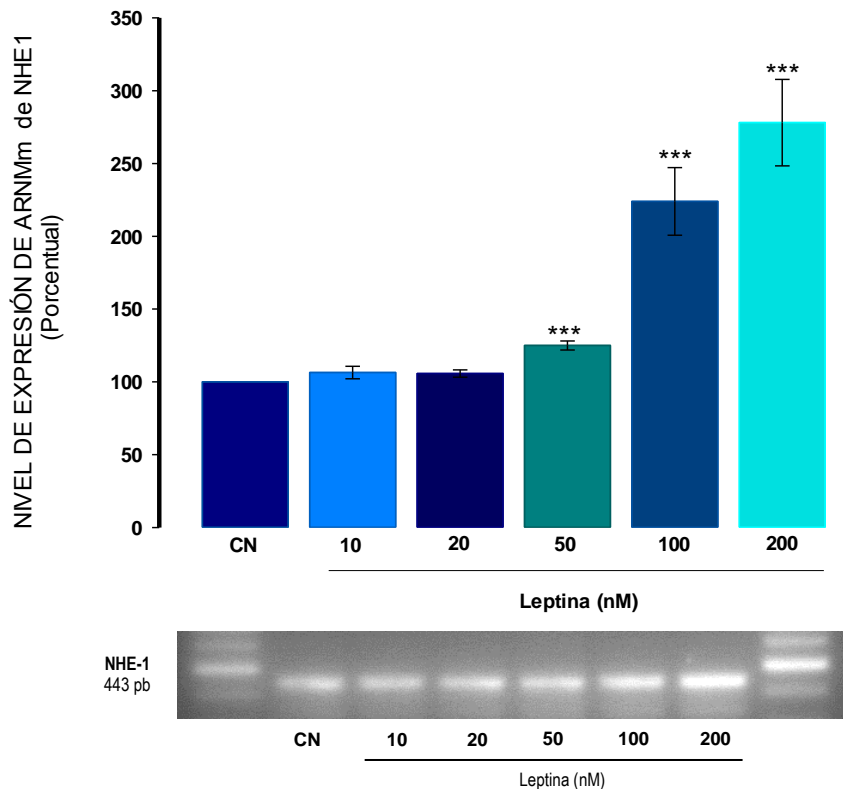


Fig. X Curva dosis-efecto de leptina sobre la expresión de la isoforma NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ en la línea tumoral MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 fueron estimuladas con dosis crecientes de la adipocina leptina (10, 20, 50, 100, 200 nM) durante 48 horas de incubación. Se realizó extracción de ARN de células MDA-MB-231 y mediante la técnica de RT-PCR se evaluó la expresión de la isoforma NHE1. La extensión del amplicón corresponde a 443 pb. Los niveles de expresión se encuentran normalizados con el valor del control interno β -actina. El valor del control fue considerado el 100% de expresión y cada condición fue relacionada con este valor para calcular el porcentaje respectivo. Los valores se presentan como el media \pm error estándar de cinco experimentos independientes (n=5) en cada condición. ***p<0.001

Análisis cuantitativo del efecto que ejerce la leptina sobre la capacidad migratoria y capacidad proliferativa en la línea celular MDA-MB-231.

En párrafos anteriores mostramos resultados preliminares que sugerían que la presencia de leptina estimula la capacidad migratoria sin afectar la capacidad proliferativa en las células MDA-MB 231. Con el fin de reforzar nuestras evidencias iniciales, decidimos realizar un análisis cuantitativo tanto de la capacidad migratoria como de la capacidad proliferativa en presencia y ausencia de leptina. Iniciamos con el análisis de la capacidad proliferativa, para lo cual realizamos una curva de crecimiento celular, donde se observa que la fase exponencial del crecimiento celular se presenta a partir de las 24 h de haber sido sembradas las células MDA-MB-231 (Figura XI).

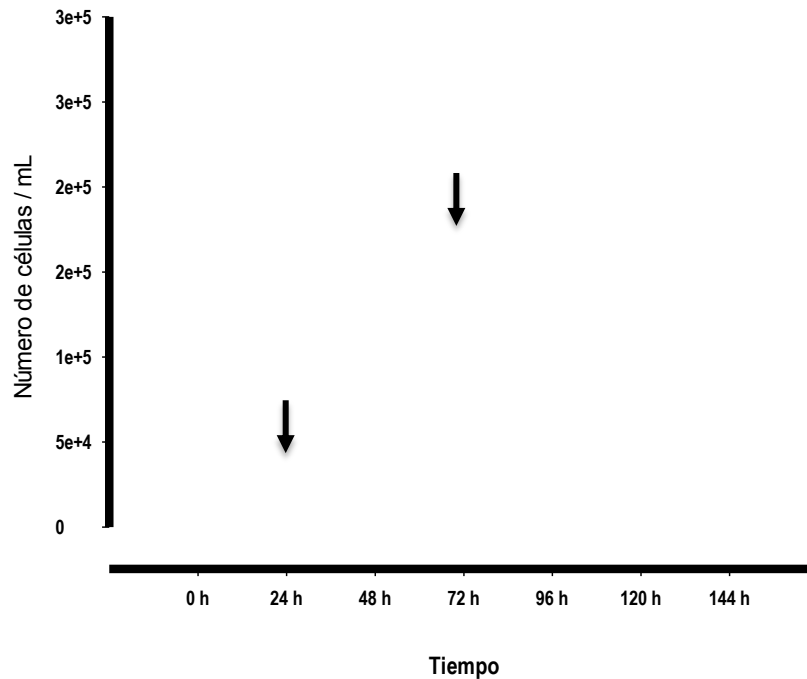


Figura XI. Curva de crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231. Curva representativa del crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231. Las células fueron sembradas en cajas Petri de 35mm, la densidad celular inicial (0h) fue de 30,000 células para cada uno de los tiempos indicados (24, 48, 72, 96, 120, 144 horas), al término de cada periodo de incubación se realizó el conteo celular mediante un contador celular automatizado Scepter 2.0. El inicio del tratamiento con leptina se realizó a las 24 horas posterior al sembrado de las células durante un periodo de 48 horas, finalizando a las 72 horas posteriores al sembrado. Las flechas indican el inicio y término del tratamiento con diferentes dosis de leptina.c

La hipótesis planteada en el presente trabajo sugiere que la leptina exagera la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231, por lo que decidimos evaluar la proliferación celular realizando el conteo celular en un citómetro de flujo portátil, lo cual asegura una determinación directa del número de células presentes en nuestras condiciones experimentales. Las células fueron tratadas con leptina a diferentes concentraciones (10, 20, 50, 100, 200 nM) durante 48h de incubación. La presencia de leptina, independientemente de la concentración empleada, no produce cambios estadísticamente significativos sobre el conteo celular con respecto a la condición control (Figura XIIA). En el apartado B de la Figura XII se presentan imágenes representativas de los histogramas obtenidos en el conteo celular, observándose un traslape casi perfecto de estos histogramas, confirmando que la presencia de leptina no modifica el número y tamaño de las células.

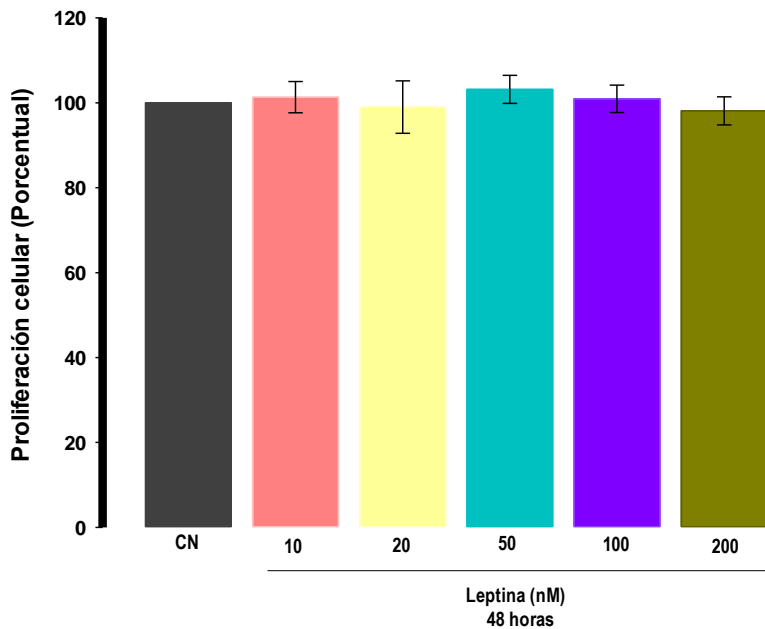
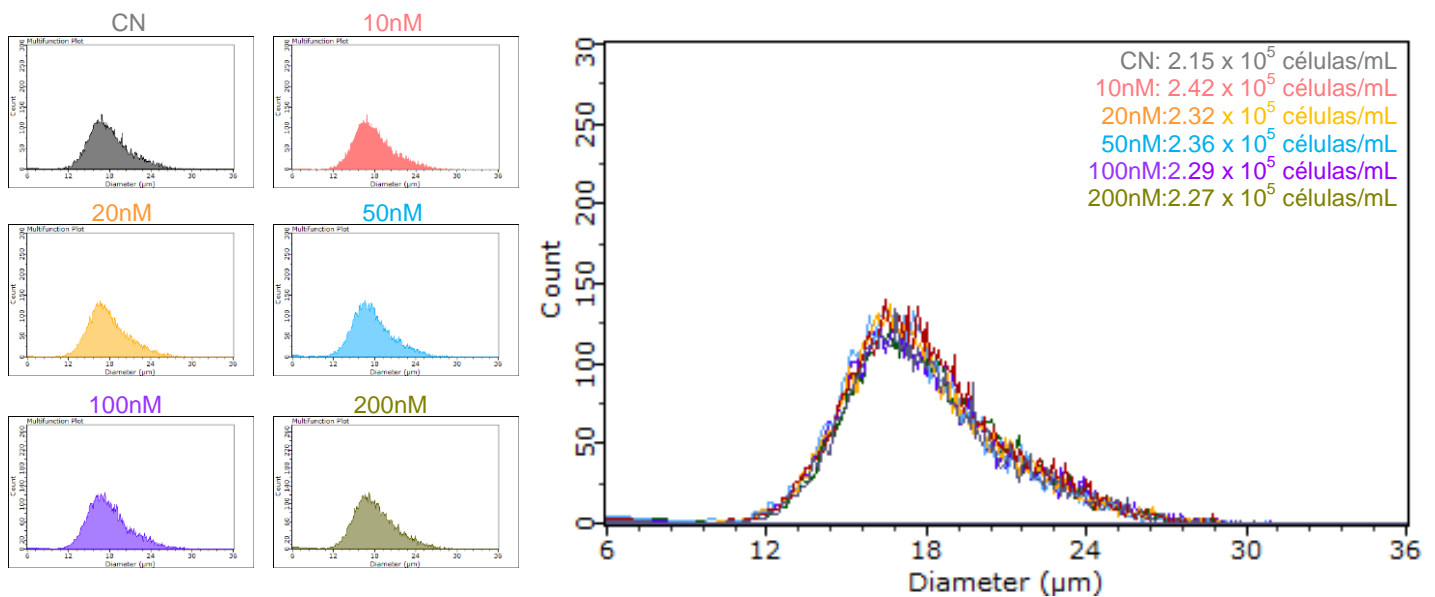
A**B**

Fig X. Efecto de leptina sobre la proliferación de la línea tumoral MDA-MB-231. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de leptina (10, 20, 50, 100, 200 nM) durante 48 horas. **A)** Las células fueron cuantificadas mediante un contador celular automatizado Scepter 2.0. La condición control fue tomada como el 100% de proliferación celular y las demás condiciones fueron relacionadas con este valor para calcular el porcentaje respectivo. Los valores obtenidos se presentan media \pm error estándar de tres experimentos independientes ($n=3$). **B)** Izquierda, histogramas representativos correspondientes a cada una de las dosis de leptina utilizadas durante 48 horas de tratamiento. Derecha, superposición de los histogramas representativos que se encuentran a la izquierda, así también se presenta el número de células por mililitro.

Con respecto a la capacidad migratoria, decidimos investigar inicialmente si el efecto que ejerce leptina sobre la capacidad migratoria depende de la duración del tratamiento. Para ello, las células MDA-MB-231 fueron tratadas con 50 nM de leptina por 24 y 48h. Conforme incrementa la duración del tratamiento se reduce el área de la herida, indicando un aumento en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 (Figura XIII A). A las 48 horas de tratamiento, el área de herida se reduce $23.8 \pm 2.2\%$ con respecto a la condición control (Figura XIII B).

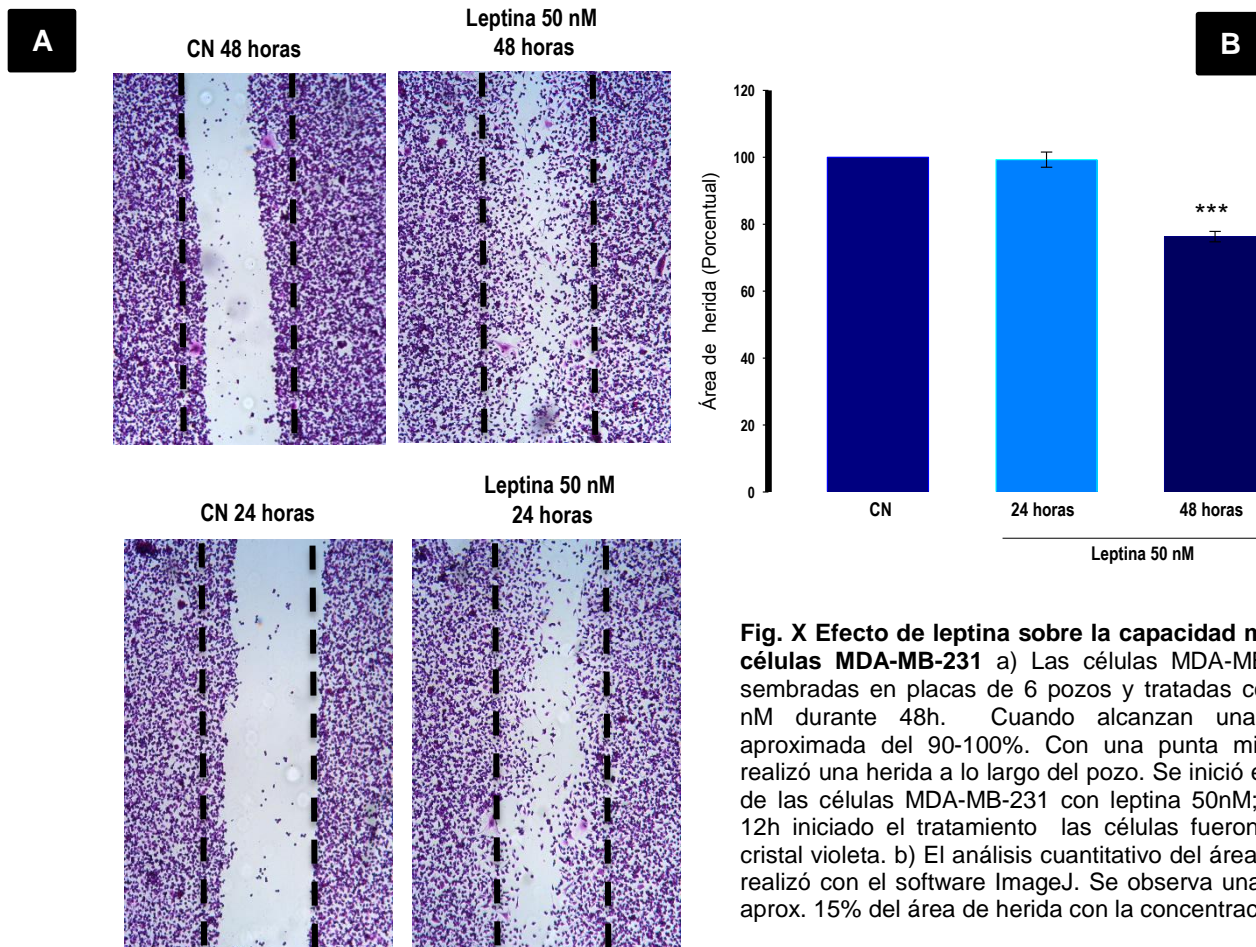


Fig. X Efecto de leptina sobre la capacidad migratoria en células MDA-MB-231 a) Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos y tratadas con leptina 50 nM durante 48h. Cuando alcanzan una confluencia aproximada del 90-100%. Con una punta micropipeta se realizó una herida a lo largo del pozo. Se inició el tratamiento de las células MDA-MB-231 con leptina 50nM; después de 12h iniciado el tratamiento las células fueron teñidas con cristal violeta. b) El análisis cuantitativo del área de herida se realizó con el software ImageJ. Se observa una disminución aprox. 15% del área de herida con la concentración 50nM.

El ensayo de cierre de herida nos permite realizar un análisis semicuantitativo de la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, por lo que decidimos evaluar de forma cuantitativa la migración celular utilizando cámaras *transwell*. Las células fueron tratadas con leptina 50 200 nM por 48 horas. El panel de la Figura XIVA muestra microfotografías del ensayo de migración celular, resultando evidente el efecto estimulador que ejerce

leptina sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Los resultados normalizados de cinco series experimentales independientes, indican que la presencia de leptina induce un incremento significativo en la migración celular, de $153.4 \pm 18\%$ para una concentración de 50 nM de leptina, y de $203.9 \pm 13.9\%$ para la concentración de 200 nM, todos con respecto a la condición control (Figura XIV B).

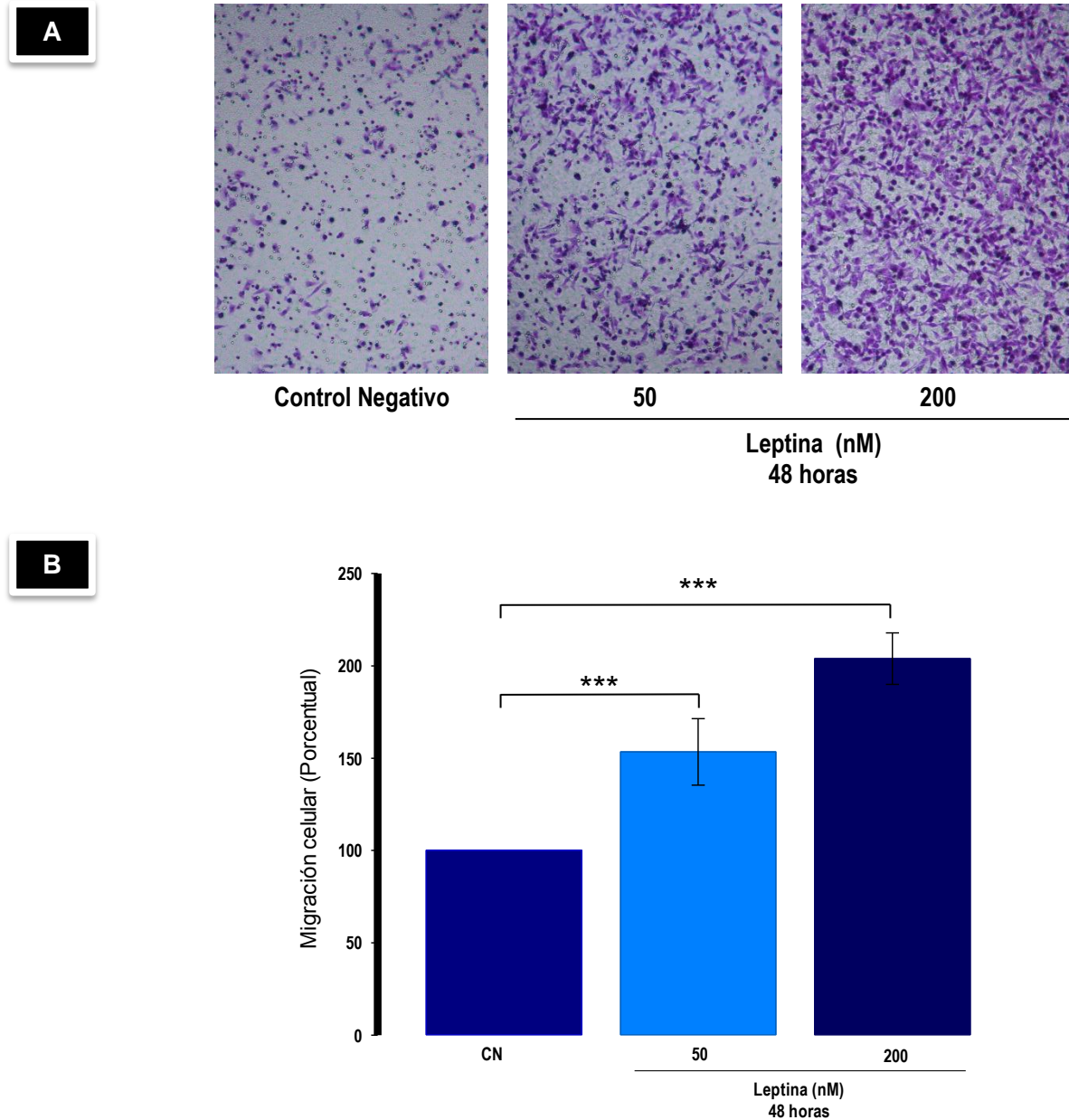


Figura X. Leptina produce un incremento significativo en la migración celular de la línea tumoral MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 fueron estimuladas con dos dosis de leptina (50, 200 nM) durante 48h. A) Las células fueron sembradas en la parte superior de la cámara de Boyden, finalizado el periodo de incubación se realizó la tinción con cristal violeta y se visualizó en el microscopio. Se tomaron 4 fotografías de campos aleatorios con un aumento de 20X. B) El conteo celular se realizó mediante el software Image J (*cell counter*). El valor de la condición control fue considerado como el 100% de migración celular y cada condición fue relacionada con este valor para calcular el porcentaje respectivo. *** $p < 0.001$

Leptina exacerba la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 mediante la expresión funcional del canal de sodio dependiente de voltaje Na_v 1.5.

La subunidad α de los canales de sodio dependientes de voltaje presenta sensibilidad al bloqueo por tetrodotoxina (TTX). Ensayos de migración en cámaras *transwell* muestran la participación activa del canal de sodio en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, ya que la presencia de TTX previene el efecto estimulador que ejerce la leptina sobre dicha capacidad (Figura XV).

Estos resultados sugieren que la exacerbación de la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 inducida por leptina es mediada al menos parcialmente por un aumento en la expresión funcional de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje Na_v1.5.

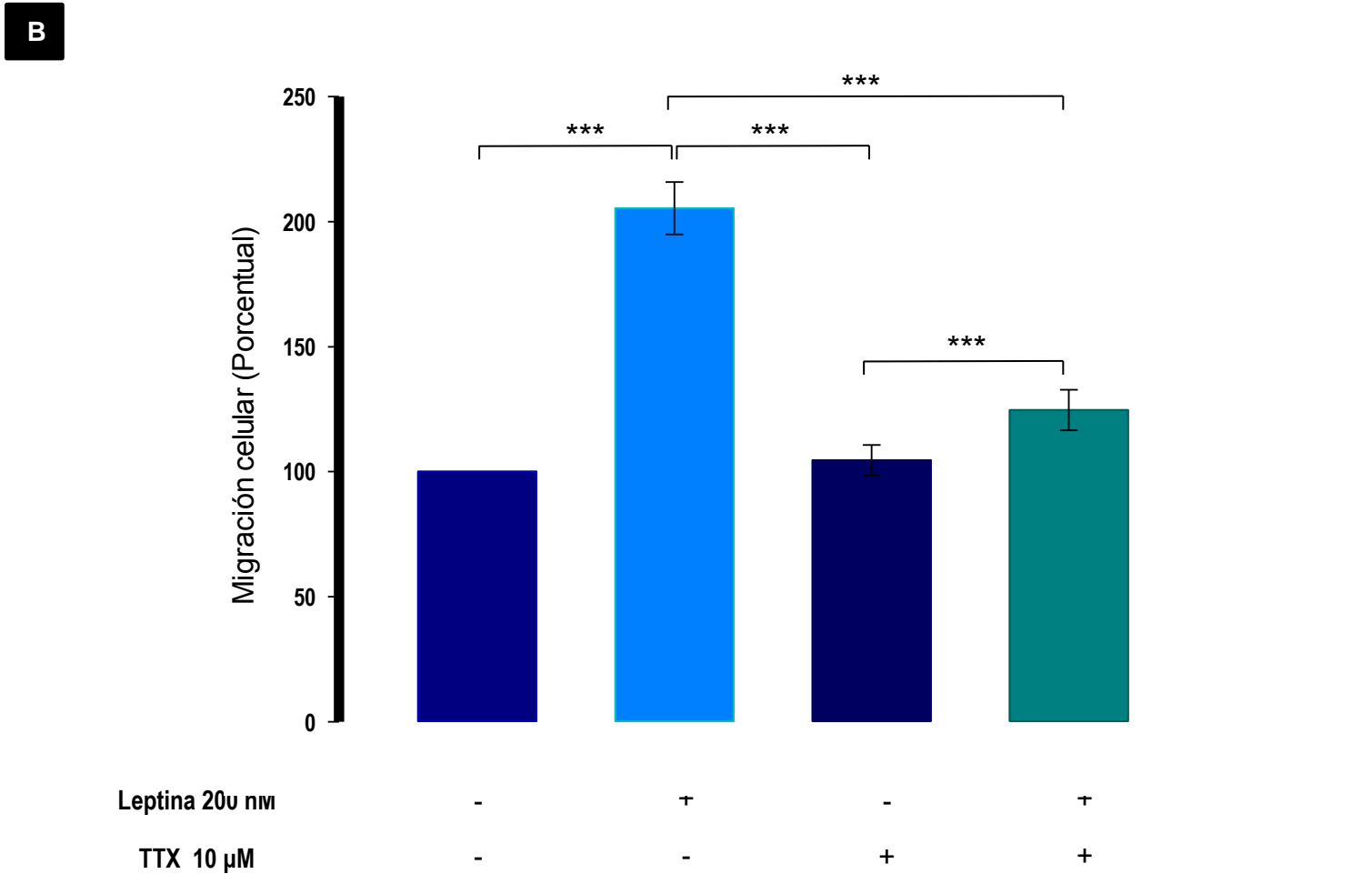
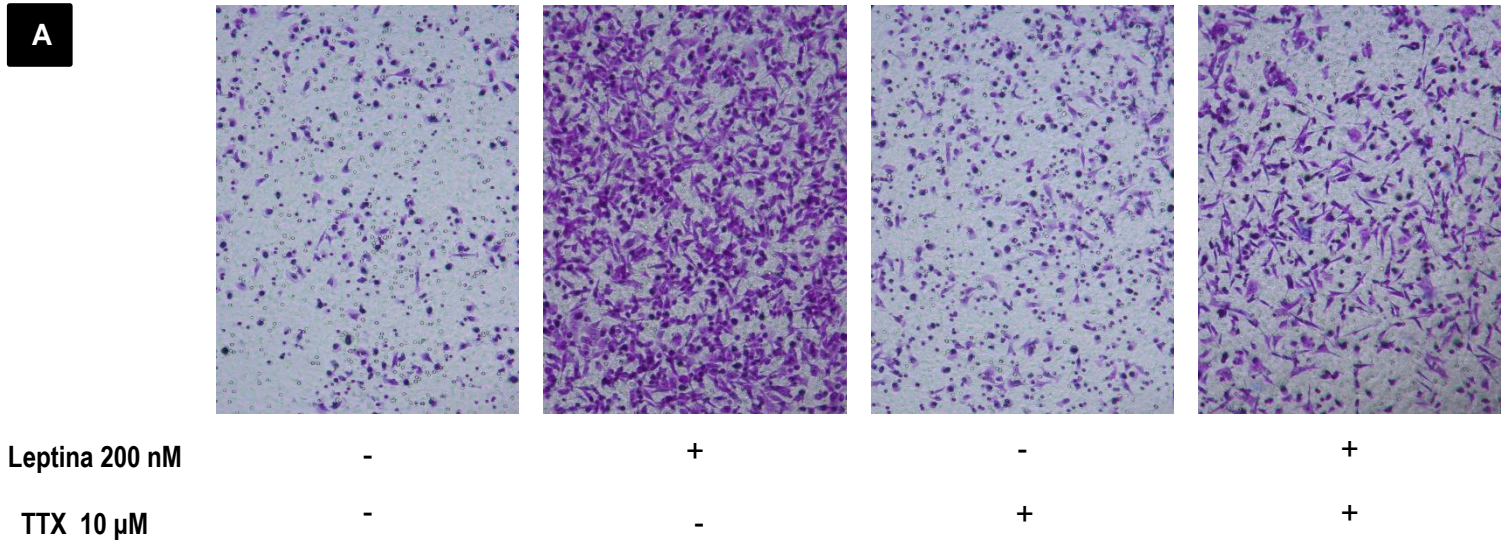


Figura X. Evidencia *in vitro* de la participación de la isoforma $Na_v1.5$ de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje en la migración celular de la línea tumoral MDA-MB-231. A) Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en la parte superior de la cámara de Boyden con una densidad celular de 3×10^5 , para las cuatro condiciones experimentales (Control Negativo, Leptina 200 nM, TTX 10 μ M, Leptina 200 nM+ TTX 10 μ M) finalizado el periodo de incubación (48h) se realizó tinción con cristal violeta, posteriormente se tomaron fotografías de cuatro campos aleatorios con un aumento de 20X. Se presentan imágenes representativas de cada una de las condiciones experimentales. B) Cuantificación de la migración celular mediante el Software Image J (*cell counter*) para las cuatro condiciones experimentales (Control Negativo, Leptina 200 nM, TTX 10 μ M, Leptina 200 nM+ TTX 10 μ M). La condición control fue tomada como el 100% de migración celular y las demás condiciones experimentales fueron relacionadas con este valor para calcular el porcentaje respectivo. Los valores obtenidos se presentan como media \pm error estándar de cinco experimentos independientes (n=5). *** $p < 0.001$

DISCUSIÓN

La obesidad representa uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo y progresión del cáncer de mama en mujeres adultas. En la condición de obesidad, los niveles plasmáticos de casi todas las adipocinas están elevados, particularmente leptina. Esta hormona que pertenece a la familia de las citocinas, participa en múltiples funciones celulares, tales como proliferación, diferenciación, angiogénesis, migración e invasión. En el presente trabajo, decidimos investigar si la capacidad metastásica de las células MDA-MB 231, provenientes de adenocarcinoma mamario, resulta exacerbada por la presencia tónica de leptina en el medio de cultivo. Inicialmente evaluamos si nuestro modelo experimental expresa el receptor a leptina, ensayos de RT-PCR muestran que las células MDA-MB 231 expresan el ARNm que codifica para el receptor a leptina (Ob-R), tal y como lo había mostrado Otvos y colaboradores en el 2011. Adicionalmente demostramos por inmunocitoquímica que este ARNm es traducido a proteína.

Se ha descrito que la expresión del receptor a leptina es importante para la expresión de factores de transcripción asociados a un fenotipo de célula madre y para el mantenimiento de un fenotipo mesénquimal en células tumorales triple negativo (Zheng et al., 2013). Esta información sugiere que el silenciamiento o inhibición del receptor a leptina pudiera reducir la progresión del cáncer mamario.

El desarrollo de modelos ortotópicos para estudiar la progresión del cáncer, que fueron generados a partir de células MDA-MB 231 y células MCF-7, mostraron que los tumores más agresivos presentaban un mayor nivel de expresión del receptor a leptina, proponiendo que la señalización activada por el receptor a leptina está asociado a la tumorigenicidad y nivel de agresividad del tumor (Ray et al., 2007). En este mismo estudio, se observó que la leptina de manera dosis-dependiente, estimulaba la proliferación de las células tumorales en las primeras 48 horas de tratamiento. A diferencia de lo que observamos en nuestro estudio, donde la presencia de leptina hasta por 72 horas no modifica la capacidad proliferativa de la línea celular MDA-MB 231, esto fue evaluado por dos métodos, el primero fue una determinación indirecta cuantificando las proteínas totales, y el segundo, fue un método directo, contando el número de células con un citómetro de flujo portátil (Scepter 2.0). Consideramos que los resultados

obtenidos por estos dos métodos confirman el hecho de que leptina no modifica la proliferación de la línea tumoral MDA-MB 231. Nuestro resultado es apoyado tanto por el grupo de Dubois (Dubois et al., 2014) y el grupo de Weichhaus (Weichhaus et al. 2014) quienes observaron que el tratamiento con leptina a diferentes concentraciones hasta por 96 horas, no modifica de manera significativa la capacidad proliferativa de la línea tumoral MDA-MB-231. Es importante mencionar que la proliferación celular disminuye cuando se emplean concentraciones mayores de 800 ng/ml de leptina, sin conocerse a detalle el mecanismo involucrado (Weichhaus et al. 2014).

La capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 en presencia y ausencia de leptina fue evaluada de manera cualitativa por ensayos de cierre de herida y de manera cuantitativa por ensayos en cámaras transwell. La presencia tónica de leptina por 48 horas produce un incremento significativo en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 con respecto a la condición control. Este resultado coincide con el reportado previamente por McMurtry y colaboradores en el 2009; y por Kim y colaboradores en el 2011, quienes observaron que leptina estimula la migración de líneas celulares de cáncer de mama positiva y negativa al receptor de estrógenos.

La leptina exagera la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 en un periodo mínimo de incubación de 24 horas, este desfase en el tiempo, nos permite inferir la participación de un mecanismo genómico que regule la expresión de proteínas asociadas a la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

La progresión del cáncer involucra que las células adquieran capacidad de migrar a un sitio lejano a su lugar de origen, lo cual se ha asociado con la expresión funcional de proteínas integrales de membrana tal como canales iónicos dependientes de voltaje e intercambiadores iónicos (Prevarskaya et al., 2010, Reshkin et al., 2000).

Se sabe que la isoforma NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ , tiene un papel esencial en la acidificación del microambiente tumoral y en la capacidad invasiva de las células de cáncer de mama (Reshkin y cols. 2000; Bourguignon et al., 2004; Busco et al., 2010; Cardone et al., 2005; Stock and Schwab, 2009). La sobreexpresión del intercambiador NHE1 en células de cáncer de mama MDA-MB 231, estimula aún más su capacidad invasiva (Onishi et al., 2012).

En el presente trabajo demostramos que la presencia tónica de leptina ejerce un efecto estimulador sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para la proteína NHE1; siendo este efecto dosis-dependiente, requiriéndose de una concentración mínima de leptina de 50nM durante 48 horas para observar cambios significativos en los niveles del ARNm.

Se ha demostrado desde hace algunos años, la presencia de los canales de sodio dependientes de voltaje en las células tumorales de diferente origen epitelial (mama, próstata, colon, cérvix), por ejemplo, se ha observado que el nivel de expresión del canal de sodio dependiente de voltaje es directamente proporcional al grado de malignidad de las células tumorales y cuya función está asociada con la progresión del cáncer (Diaz et al., 2007; Hernandez-Plata et al., 2012; House et al., 2010; Roger et al., 2006; Roger et al., 2007; Yildirim et al., 2012).

En el año 2005, Fraser y colaboradores demostraron que las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB 231 y MCF-7 expresan canales de sodio dependientes de voltaje, y que el nivel de expresión de estos canales es mayor en la línea metastásica MDA-MB 231 en comparación con la línea celular de MCF-7 de baja actividad metastásica. La actividad del canal de sodio está íntimamente relacionada con la capacidad migratoria e invasiva de las células de cáncer de mama. La isoforma de canal de sodio dependiente de voltaje que es predominantemente expresada en células de cáncer de mama es la Na_v 1.5 en su forma neonatal (Chioni et al., 2009).

En nuestro modelo experimental observamos que la presencia de leptina induce un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para la isoforma del canal de sodio dependiente de voltaje Na_v 1.5, y que esta expresión es necesaria para exacerbar la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, ya que al incubar estas células en presencia de TTX, la capacidad migratoria estimulada por leptina resulta reducida.

Las evidencias experimentales obtenidas en el presente trabajo nos permiten proponer que la condición de obesidad, representada por un incremento sostenido en los niveles extracelulares de leptina, es un factor determinante en estimular la capacidad migratoria de células tumorales de mama, favoreciendo su capacidad metastásica. El

efecto observado sobre la capacidad migratoria es mediado al menos en parte, por la sobre-expresión de dos proteínas integrales de membrana, la isoforma $\text{Na}_v 1.5$ del canal de sodio, y la isoforma NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ .

Suponemos que un incremento en la expresión funcional de canales de sodio $\text{Na}_v 1.5$ generará un mayor flujo de iones sodio al interior celular, con un aumento en la concentración intracelular de dicho ion, lo cual provocará que la actividad normal del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cambie de sentido, en vez de sacar calcio y meter sodio, sacará sodio y meterá calcio, esto incrementará la concentración intracelular de calcio libre lo cual permitirá la reorganización del citoesqueleto para la formación de lamelopoidos o filopodios, y de esta manera facilitar la migración celular. Por otro lado, la sobre-expresión del intercambiador Na^+/H^+ aumentará la salida de protones, generando así, la acidificación del medio extracelular, condición necesaria para la activación de metaloproteinasas, enzimas que degradan la matriz extracelular, y de esta manera estimular la capacidad invasiva de las células MDA-MB 231.

Es un hecho que la expresión funcional del canal de sodio dependiente de voltaje $\text{Na}_v 1.5$ y del intercambiador NHE1, están relacionados con la capacidad metastásica de las células tumorales de cáncer de mama, y que su nivel de expresión es estimulado de manera significativa por la presencia de leptina, marcador hormonal de la condición de obesidad.

CONCLUSIONES

1. Las células de la línea tumoral MDA-MB 231 expresan el ARNm y la proteína del receptor a leptina (ObR).
2. La presencia de leptina no afecta la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231.
3. La capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 resulta exacerbada por la presencia de leptina, siendo este efecto dependiente tanto de la dosis como de la duración del tratamiento.
4. El incremento observado en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 en presencia de leptina, se debe al menos parcialmente a la sobre-expresión funcional de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje $\text{Na}_v1.5$, ya que al incubar las células en presencia de TTX se previene el efecto estimulador de leptina.
5. El nivel de expresión del ARNm que codifica para la subunidad $\text{Na}_v 1.5$ depende de la concentración de leptina empleada, así como de la duración del tratamiento.
6. La presencia de leptina induce un incremento significativo en los niveles del ARNm que codifica para el intercambiador Na^+/H^+ , isoforma NHE1, proteína de membrana importante para asegurar la capacidad invasiva de las células tumorales. Los niveles del ARNm para NHE1 detectado, dependen de la concentración de leptina y de la duración del tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1] Ahmad KA, Iskandar KB, Hirpara JL, Clement MV, Pervaiz S (2004) Hydrogen peroxide-mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of Bax during druginduced apoptosis of tumor cells. *Cancer Res.* 64:7867–7878
- 2] Amith SR, Wilkinson JM, Baksh S, Fliegel L. The Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) as a novel co-adjuvant target in paclitaxel therapy of triple-negative breast cancer cells. 2015. *Oncotarget.* 6(2):1262-1275
- 3] Aronson PS, Nee J, Suhm MA. 1982 Modifier role of internal H_p in activating the Na⁺/H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299, 161–163.
- 4] Blüher M. 2009. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117:241–250
- 5] Calle EE, Kaaks R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 4(8)579-591
- 6] Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. 2005. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer.* 5:786-95
- 7] Carroll PA, Healy L, Lysaght J, Boyle T, Reynolds JV, et al. 2011. Influence of the metabolic syndrome on leptin and leptin receptor in breast cancer. *Mol Carcinog* 50, 643–651
- 8] Chen DC, Chung YF, Yeh YT, Chaung HC, Kuo FC, et al. 2006. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer Lett* 237, 109–114
- 9] Chioni AM, Isom LL, Djamgoz MB. Adhesion of human breast cancer cell lines: role of voltagegated sodium channel β1 subunit. 2006. *Proc Physiol Soc.* 3:PC187.
- 10] Chioni AM, Isom LL, Djamgoz MB. Adhesion of human breast cancer cell lines: role of voltagegated sodium channel β1 subunit. 2006. *Proc Physiol Soc.* 3:PC187.
- 11] Chua SC, Jr., Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, et al. 1997. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics.* 45(2):264-70.
- 12] Dalamaga M. 2013. Obesity, insulin resistance, adipocytokines and breast cancer: New biomarkers and attractive therapeutic targets. 3(3):34-42
- 13] Diaz D, Delgadillo DM, Hernandez-Gallegos E, Ramirez-Dominguez ME, Hinojosa LM, Ortiz CS, et al. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol.* 2007; 210: 469–478. [PubMed: 17051596]
- 14] Diss JK, Archer SN, Hirano J, Fraser SP, Djamgoz MB. 2001. Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate.* 48(3):165– 178.
- 15] Dubois V, Jardé T, Delort L, Billard H, Bernard-Gallon D, Berger E, Geloën A, Vasson MP, Caldefie-Chezet F. 2014. Leptin induces a proliferative

- response in breast cancer cells but not in normal breast cells. *Nutr Cancer*. 66(4):645-55
- 16] Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska M, Pan H, Yamaci RF. 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*. 11:5381–5389.
- 17] Gao, Rui., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., Wang, Z. 2009. Functional Expression of Voltage-Gated sodium Channels Nav1.5 in Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB 231. *J. Huazhong Univ Sci Technol*.
- 18] Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 28:365–368.
- 19] Griffiths JR (1991) Are cancer cells acidic? *Br J Cancer* 64:425–427
- 20] Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ, Downing JE, Laniado ME, Foster CS. 1995. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett*. 369(2–3):290–294.
- 21] Grinstein, S., Rotin, D., Marson, M.J. 1989. Na⁺/H⁺exchanger and growth factor-induced cytosolic pH change. Role in cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 988:73-91
- 22] Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, et al. 2010. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer Metastasis Rev*. 29:641–53
- 23] Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP 2008 Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367–377
- 24] Hamann A, Matthaei S. 1996. Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 104:293-300
- 25] Han CZ, Du LL, Jing JX, Zhao XW, Tian FG, et al. 2008. Associations among lipids, leptin, and leptin receptor gene Gin223Arg polymorphisms and breast cancer in China. *Biol Trace Elem Res* 126, 38 48
- 26] Hanahan D, Weinberg R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144(5):646-674
- 27] Hancke K, Grubeck D, Hauser N, Kreienberg R, Weiss JM, et al. 2010. Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 119, 367–370
- 28] Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, Forbes NS, Jain RK (2002) Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res*. 8:1284–1291
- 29] Hernandez-Plata E, Ortiz CS, Marquina-Castillo B, Medina-Martinez I, Alfaro A, Berumen J, et al. Overexpression of Na(V) 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int J Cancer*. 2012; 130: 2013–2023.
- 30] Huang L, Li C. 2000. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res*. 10:81-92
- 31] Ishikawa, M., Kitayama, J., and Nagawa, H. 2004. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin. Cancer Res*. 10, 4325–4331.
- 32] Isom LL, Catterall WA. 1996. Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature*. 383(6598):307–308

- 33] Isom LL, De Jongh KS, Catterall WA. 1994. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron*. 12:1183–1194.
- 34] Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H. 1992. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*. 256(5058):839–842
- 35] Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhangal G, Djamgoz MB. 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol*. 150(4):1213–1221
- 36] Maccio A, Madeddu, and Mantovani G. 2009. Adipose tissue as target organ in the treatment of hormone-dependent breast cancer: new therapeutic perspectives. *Obes Rev* 10, 660–670
- 37] Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL. Sodium channel β subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol. Chem*. 275:11383–11388.
- 38] McEwen DP, Meadows LS, Chen C, Thyagarajan V, Isom LL. 2004 Sodium channel β 1 subunit mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. *J Biol Chem*. 279:16044–16049
- 39] McMurtry, V., Simeone, A. M., Nieves-Alicea, R., and Tari, A. M. 2009. Leptin utilizes Jun N-terminal kinases to stimulate the invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 197–204.
- 40] Murer, H., Hopfer, U., Kinne, R. 1976. Sodium, proton antiport in brush border membranes isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem. J*. 154:597-602
- 41] Pan SY, DesMeules M. 2009. Energy intake, physical activity, energy balance, and cancer: epidemiologic evidence. *Methods Mol Biol*. (472)191-215
- 42] Percick R, Stumvoll. 2009. Obesity and cancer. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 117:563-566
- 43] Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 16: 107–121
- 44] Raghunand N, Gatenby RA, Gillies RJ (2003) Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *Br J Radiol*. 76(1):S11–S22
- 45] Ray A, Nkhata KJ, Cleary MP. 2007. Effects of leptin on human breast cancer cell lines in relationship to estrogen receptor and HER2 status. *Int J Oncol* 30(6):1499–1509
- 46] Reshkin SJ, Bellizzi A, Albarani V, Guerra L, Tommasino M, Paradiso A, Casavola V (2000) Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* 275:5361–5369
- 47] Roger S, Besson P, Le Guennec JY. 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta*. 1616(2):107–111.

- 48] Roger S, Rollin J, Barascu A, Besson P, Raynal PI, lochmann S, et al. 2007. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39: 774–786.
- 49] Tartaglia LA , Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB -R. *Cell*. 83(7):1263-71.
- 50] Tartaglia LA. 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 272(10):6093-6.
- 51] Tessitore., Vizio B, Pesola D, Cecchini F, Mussa A, et al. 2004. Adipocyte expression and circulating levels of leptin increase in both gynaecological and breast cancer patients. *Int J Oncol* 24, 1529 1535
- 52] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gen and its human homologue. *Nature*. 372:425-432