



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del**

**Instituto Politécnico Nacional**

Departamento de Biología Celular

Unidad Zacatenco

**Papel de la eritropoyetina en procesos de migración e invasión en células  
epiteliales mamarias MCF10A**

Tesis que presenta

**M. en C. Lizeth Alejandra Ordoñez Moreno**

Para obtener el Grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOLOGÍA CELULAR**

Directores de Tesis:

**Dr. José Eduardo Pérez Salazar**

**Dr. Julio Isael Pérez Carreón**

México, Ciudad de México

Octubre 2017

Este trabajo fue financiado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), otorgado para el proyecto. Estudio del papel de las oxigenasas Cox y Lox en los procesos de migración e invasión inducidas por el ácido graso linoleico en células cancerosas mamarias, del subprograma de ciencia básica (No. 255429) y también apoyado por el proyecto CB-0182450.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar, por su enorme paciencia, apoyo y por hacerme madurar.
- Al Dr. Pedro Cortes Reynosa, por su apoyo y comprensión.
- Al Dr. Julio Isael Pérez Carreón, por su gran disposición y su apoyo.
- A Norita Ruiz, por su apoyo y su gran amistad.
- A Clara Hernández Chávez, por todo su gran apoyo, paciencia y disposición administrativa.
- A Blanca Olguín por su ayuda administrativa.
- A mis sinodales, el Dr. Saúl Villa, Dr. Federico Castro, Dr. Mario Rodríguez, Dr. Antony Boucard, por su asesoría y disposición.
- A mis amigos ... no los menciono porque bien saben quiénes son. No sé si con ustedes cometí más o menos “experiencias de vida”, pero agradezco cada una de ellas.
- A todas aquellas personas que sienten algo por mí. A las que creen en mí, se los agradezco infinitamente y tienen mi cariño y amistad incondicional. A las que no, recuerden que hasta una patada te impulsa.

## **DEDICATORIAS**

**A mis padres; nunca podre agradecerles todo lo que han hecho por mí, todas las veces que me han levantado, los amo. Doy gracias a Dios por tenerlos.**

**A mis hermanos; gracias por estar y ser. Los amo muchísimo.**

**A mi familia, los quiero.**

**A toda aquella persona que ha estado en la misma situación, que ha estado frente a una hoja en blanco y ha tenido que auto probar su capacidad para llenarla no solo de palabras acomodadas, sino de aquellas que formen frases capaces de transmitir un entendimiento personal sobre un tema de interés.**

**Albert Einstein (1879-1955)**

**“La ciencia no es más que un refinamiento del pensamiento cotidiano”.**

**“No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela”.**

**“Todos somos ignorantes, lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas”.**

## Contenido

Abreviaturas .....	v
Relación de figuras .....	vii
I.- Resumen .....	viii
II.- Abstract.....	ix
III.- INTRODUCCIÓN.....	1
III.I.- Cáncer .....	1
III.II.- La glándula mamaria .....	2
III. III.- Factores de Riesgo.....	4
III.IV.- Anemia.....	5
III.V.- Eritropoyetina .....	7
III.VI.- Transición epitelio-mesénquima.....	12
III.VII.- Migración celular FAK y Src .....	14
III.VIII.- Cadherinas .....	15
III.IX.- Filamentos Intermedios.....	16
III.X.- Metaloproteinasas de matriz .....	17
III.XI.- Factores de transcripción.....	18
IV.- Justificación .....	21
V.- Hipótesis.....	22
VI.- Objetivos .....	22
VII.- Material y Métodos.....	23
VIII.- Resultados .....	32
X.- Discusión .....	47
XI.- Conclusión .....	54
XII.- Referencias .....	55
XIII.- Anexo artículo .....	61

## **Abreviaturas**

OMS: Organización Mundial de la Salud

ADH: Hiperplasia ductal atípica

DCIS: Carcinoma ductal *in situ*

DCI: Carcinoma ductal invasivo

EMT: Transición epitelio mesénquima

BM: Membrana basal

EPO: Eritropoyetina

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

ASCO: Sociedad Americana de Oncología Clínica

EORTC: Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer

EPOR: Receptor de eritropoyetina

HIF-2: Factor inducible por hipoxia

HNF-4 $\alpha$ : Factor nuclear 4 alfa de hepatocito

AP-1: Activador de proteína 1

JAK2: Cinasa Janus 2

STAT5: Transductor de Señal y Activador de la Transcripción tipo 5

MAPKs: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa

SOCs: supresor de la señalización de citocinas

SHP-1: Proteína fosfatasa de tirosinas

RNA: Ácido ribonucleico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ERBB2: Receptor del factor de crecimiento epidermal tipo 2

ECM: Matriz extracelular

MMP-2: Metaloproteinasa de matriz 2

MMP-9: Metaloproteinasa de matriz 9

WB: Ensayo de inmunodetección

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real

## **Relación de figuras**

Figura 1.- EPO induce migración en la línea celular de epitelio mamario MCF10A.

Figura 2.- EPO induce invasión en la línea celular de epitelio mamario MCF10A.

Figura 3.- EPO induce activación de FAK y Src en la línea celular MCF10A.

Figura 4.- EPO induce un fenotipo mesenquimal en células epiteliales mamarias MCF10A.

Figura 5.- EPO promueve sobreexpresión de vimentina en los bordes de migración celular.

Figura 6.- EPO desregula la transcripción de E-cadherina.

Figura 7.- EPO induce incremento en la actividad de interacción de cajas E con factores de transcripción.

Figura 8.- EPO induce desregulación génica de factores de transcripción que participan en EMT.

Figura 9.- EPO induce incremento en la actividad de unión de NF- $\kappa$ B al DNA.

Figura 10.- NF- $\kappa$ B incrementa la transcripción de Snail1.

Figura 11.- EPO induce secreción de metaloproteinasas de matriz en células MCF10A.

Figura 12.-Expresión génica diferencial de células MCF10A tratadas con EPO.

Figura 13.- Análisis en base de datos de los genes diferencia en células tratadas con EPO.



## **I.- Resumen**

El cáncer de mama es la primera causa de muerte, a nivel mundial, por tumores malignos en mujeres mayores de 25 años. Estudios epidemiológicos han asociado el desarrollo de un estado anémico con el cáncer. La eritropoyetina (EPO), es el principal agente estimulador de eritropoyesis, a partir de los años ochenta se empleó con el fin de corregir el estado anémico. Sin embargo, estudios recientes reportan un aumento en la mortalidad bajo este tratamiento, por tal motivo se busca evaluar el efecto de la EPO sobre la progresión tumoral. La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso donde las células tumorales desregulan la expresión de proteínas presentes en células epiteliales como E-cadherina, ocludinas y claudinas, sobreexpresando proteínas características de células mesenquimales como N-cadherina y vimentina, confiriéndole a la célula la capacidad de migrar e invadir. Nuestros hallazgos sugieren que EPO, promueve la adquisición de un fenotipo mesenquimal en células epiteliales mamarias a través del proceso de EMT, además, de la inducción en la expresión diferencial de genes en células MCF10A. Por lo anterior, proponemos que EPO está participando en la progresión tumoral mediante el cambio de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal y por lo tanto la activación de la maquinaria necesaria capaz de promover la migración e invasión en células MCF10A.

## **II.- Abstract**

Breast cancer is the leading cause of death globally for malignant tumors in women older than 25 years. Epidemiological studies have associated the development of an anemic state with cancer. Erythropoietin (EPO), is the main stimulating agent of erythropoiesis, being used in the eighties to correct the anemic condition. However, recent studies report an increase in mortality under this treatment, for this reason it is sought to evaluate the effect of EPO on tumor progression. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process where tumor cells lose the expression of proteins present in epithelial cells such as E-cadherin, occludins and claudins, gaining expression of proteins characteristic of mesenchymal cells such as N-cadherin and vimentin, conferring on the cells the ability to migrate and invade.

Our findings suggest that EPO promotes the acquisition of a mesenchymal phenotype in mammary epithelial cells through the EMT process in addition to induction in differential gene expression. Therefore, we propose that EPO is participating in tumor progression by changing from an epithelial phenotype to a mesenchymal phenotype and therefore the activation of the necessary machinery capable of promoting migration and invasion in MCF10A cells.

### **III.- INTRODUCCIÓN**

#### **III.I.- Cáncer**

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una enfermedad de etiología compleja y multifactorial. La cual tiene como principal característica la proliferación descontrolada de células transformadas capaces de migrar/invadir a través del tejido circundante, entrar al torrente sanguíneo y/o linfático e invadir órganos secundarios. Este último paso es conocido como metástasis y es la principal causa de muerte por esta patología [1, 2].

El cáncer de mama es considerado a nivel mundial la primera causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años, con cerca de 500 mil muertes anuales [1]. La incidencia varía considerablemente en todo el mundo, siendo más alta en Europa y Norteamérica, con cifras de 99.4 por cada 100 mil mujeres. México ocupa un lugar intermedio con una tasa de incidencia de 40 por cada 100 mil mujeres [3]. El porcentaje de anemia de acuerdo al estadio clínico es de 7.4 % para estadios 0 y I, 34.4 % para estadio II, 42.1 % para estadios III y IV, así como 16.1 % para los no clasificables. Diversos reportes muestran que esta incidencia ha ido en aumento a partir del 2006 y se ve reflejada por el incremento de la tasa estandarizada de mortalidad, la cual se estima en 18.7 por cada 100 mil mujeres, representando un incremento del 49.5 % para el año 2010 [4].

El análisis de mortalidad por entidad federativa de la República Mexicana, muestra que las tasas más altas se encuentran en centro y norte del país con un 13.4 % para la Ciudad de México, 12.4 % para el Estado de México, 8.2 % para Jalisco, 6.4 % para Veracruz, 6 % en Nuevo León y 3.8 % para Guanajuato. Entre las décadas de

1990 y 2010 se reportó un aumento en la tasa de mortalidad siendo los estados más afectados Chihuahua, Coahuila y Guerrero hasta con un 200 % de incremento, en contraste con aquellos estados en los que hubo una menor elevación como, Aguascalientes, Durango y Baja California [4]. Dado el incremento en la tasa de incidencias y de mortalidad, es de suma importancia el abordaje en el entendimiento de la etiología y progresión de la enfermedad.

### **III.II.- La glándula mamaria**

La glándula mamaria es un órgano especializado para la producción de leche en etapas de lactancia. Su desarrollo comienza en el embrión a partir de la séptima semana, mostrándose como un engrosamiento de la epidermis. Al final de la vida intrauterina los brotes epiteliales se canalizan para formar los conductos galactóforos, mientras que los esbozos constituyen los conductos de menor calibre y los alveolos de la glándula [5]. Dentro de la mama, las glándulas se denominan como tubuloalveolares compuestas y consisten de entre 15 a 20 lóbulos que se irradian desde el pezón y se separan entre sí por tejido adiposo y conectivo, vasos sanguíneos, linfáticos y algunos tipos celulares como fibroblastos. [6]. Los lóbulos son drenados por un conducto lactífero propio, que se engrosa para formar el seno lactífero antes de llegar al pezón. Los conductos y lobulillos están formados por dos tipos celulares, las células mioepiteliales que se disponen entre la membrana basal (BM) y las células epiteliales lumbinales [7]. Por otra parte, también existen dos tipos de estroma mamario, el estroma interlobulillar que corresponde a un tejido conjuntivo fibroso denso mezclado con tejido adiposo y el estroma intralobulillar que

rodea a los acinos de los lobulillos y está constituido por células similares a fibroblastos [6, 7].

El cáncer de mama se puede desarrollar a partir de cualquier tipo celular que conforma esta estructura. Por muchos años los tumores se han clasificado de acuerdo a su histología. Entre los principales tipos histológicos de carcinoma de mama se encuentran el carcinoma ductal (79%), lobulillar (10%), tubular (6%), mucinoso (2%) medular (2%), papilar y metaplásico (1%) [8, 9].

El inicio de esta patología comienza con una hiperplasia ductal atípica (ADH), término con que se designa a la hiperproliferación de células que han perdido su morfología habitual. Esta hiperplasia puede evolucionar a carcinoma ductal *in situ* (DCIS), en el que las células ocupan el espacio luminal, aunque aún se encuentran confinadas a los límites del ducto. Una vez que las células invaden tejido circundante, se denomina carcinoma ductal invasivo (DCI) [10]. En esta etapa las células transformadas migran a través de la BM hasta alcanzar vasos sanguíneos y/o linfáticos, mediante un proceso conocido como intravasación. Las células tumorales entran y sobreviven en circulación hasta llegar a sitios distantes donde ocurre el proceso inverso, la extravasación, que les permite salir del torrente sanguíneo y/o linfático dando paso a la proliferación de células procedentes del tumor primario en un nuevo órgano como hueso, hígado, cerebro y pulmón [11, 12]. La formación de tumores secundarios en los diferentes órganos es un proceso conocido como metástasis. Una característica importante que ocurre durante este proceso es, la pérdida del fenotipo epitelial y la ganancia de un fenotipo mesenquimal. Este cambio de fenotipo confiere a las células la capacidad de migrar

e invadir órganos secundarios, promoviendo la manifestación de las formas agresivas de la enfermedad [13].

### **III. III.- Factores de Riesgo**

En los últimos 20 años de investigación epidemiológica en cáncer de mama, se ha identificado que solo del 5 al 10 % de los pacientes sufren cáncer tipo hereditario, el cual se desarrolla antes del primer tercio de vida, mientras que en el 90 % restante se manifiesta a partir de la tercera década de vida y su desarrollo se ha relacionado con algunos factores de riesgo, entre los que se encuentran [14, 15]:

#### *A) Factores biológicos:*

- Sexo femenino.
- Envejecimiento: mayor edad, mayor riesgo.
- Antecedente personal o familiar de cáncer en madre, hijas o hermanas.
- Antecedentes de hallazgos de hiperplasia.
- Vida menstrual mayor a 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años).
- Alta densidad mamaria.
- Ser portador de mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*.

#### *B) Factores ambientales:*

- Exposición a radiaciones ionizantes, principalmente durante la pubertad.
- Tratamiento con radioterapia en tórax.

#### *C) Factores de riesgo relacionados con los antecedentes reproductivos:*

- Nuliparidad.
- Primer embarazo a término después de los 30 años de edad.

- Terapia hormonal en la perimenopausia o postmenopausia por más de cinco años.

*D) Factores de riesgo relacionados con estilo de vida:*

- Alimentación baja en fibra y rica en carbohidratos y grasas.
- Obesidad, principalmente en la posmenopausia.
- Sedentarismo.
- Consumo de alcohol mayor a 15 g/día.
- Tabaquismo.

### **III.IV.- Anemia**

La OMS, considera un estado anémico a sujetos que tengan niveles de hemoglobina inferiores a 12 g/dl, los cuales se subdividen en [16, 17]:

Anemia leve: 11.9 - 10.0 g/dl

Anemia moderada: 9.9 – 8.0 g/dl

Anemia severa:  $\leq$  8.0 g/dl

La anemia está fuertemente relacionada con el cáncer, empeorando la calidad de vida y el tratamiento clínico del paciente [18, 19]. La anemia relacionada al cáncer en pacientes sin tratamiento antineoplásico es poco definida y puede estar relacionada con varios aspectos como la presencia de citocinas inflamatorias, infiltración de la médula ósea o deficiencias nutricionales [17, 20, 21]. Diversos estudios muestran que en pacientes anémicos la eficacia de tratamiento antineoplásico es menor, en comparación con aquellos pacientes que tienen niveles de hemoglobina normales [22, 23]. La anemia conlleva a una disminución en la

calidad de vida del paciente, debido a la debilidad, mareo y cansancio que les impide realizar de manera eficaz las actividades diarias [18]. Por otra parte, se ha reportado que la anemia aumenta la tasa de recurrencia del cáncer y el fracaso locorregional, así como disminuye la tasa de supervivencia [24-27].

En la población recién diagnosticada con cáncer el 53.7 % de los pacientes presenta un grado anémico. De esta fracción el 38.5 % corresponde a pacientes con anemia leve, el 13.8 % con anemia moderada y el 1.4 % con anemia severa. Aunado a estos datos, también se ha reportado que los diferentes tratamientos empleados para contrarrestar el cáncer incrementan la incidencia anémica [28, 29]. Los pacientes que reciben radioterapia, la anemia se estima en un 19.5 %, mientras que en pacientes que reciben en conjunto radioterapia y quimioterapia refleja un 41.9 %. Cabe señalar que los pacientes que reciben quimioterapia muestran la mayor incidencia, aproximadamente de 62.7 %. A partir del primer ciclo de quimioterapia, el porcentaje de pacientes anémicos que se reporta es del 19.5 %; para el segundo ciclo aumenta a un 34.3 %, en el tercer ciclo se incrementa a un 42 % y para el ciclo 5 y posteriores se reportan cifras mayores al 64.7 % [29].

Con el fin de compensar el estado anémico, los pacientes han sido sometidos a transfusiones sanguíneas, lo que representa un alto costo y un incremento en el riesgo de contraer otro tipo de enfermedades infecciosas [19, 21, 30]. A mediados de los años ochenta se implementó el tratamiento con eritropoyetina (EPO) con el fin de corregir el estado anémico, dando excelentes resultados [19, 24]. Sin embargo, estudios recientes demuestran resultados negativos con respecto al uso de EPO en algunos tipos de cáncer; como lo reportado por Leyland-Jones y



colaboradores (2003), donde se evaluó a 939 mujeres con cáncer de mama metastásico, las cuales fueron tratadas con EPO alfa o placebo para mantener los niveles de hemoglobina entre 12 y 14 g/dl. Después de cuatro meses la relación de mortalidad fue significativamente mayor en el grupo tratado con EPO en comparación con el grupo tratado con placebo [31]. Otro reporte realizado por Henke y colaboradores (2003), muestra que a 351 pacientes de cáncer de cabeza y cuello se les administro EPO beta para mantener los niveles de hemoglobina 14 g/dl para mujeres y 15 g/dl para hombres. El estudio reveló que la supervivencia fue menor en el grupo tratado con EPO, en comparación con el grupo tratado con placebo [32]. Un meta análisis realizado por Bennett (2008) y estudios realizados por Bohlius y colaboradores (2005 – 2006), muestran aumento en la mortalidad de pacientes con cáncer tratados con EPO [33-35].

Con base en estos datos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) y la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC), proponen lineamientos para el uso de EPO en la anemia relacionada al cáncer [19, 28, 36]. Así mismo, en diciembre del 2007, se establece que es necesario investigar sobre el papel de EPO y su receptor en células tumorales, en cuanto a su participación en progresión tumoral, así como los posibles efectos secundarios [33, 37].

### **III.V.- Eritropoyetina**

La eritropoyetina es una glicoproteína de aproximadamente 34 kDa, producida principalmente por el hígado en etapa fetal y por el riñón en adulto [30]. Esta proteína es el principal agente estimulador de eritropoyesis, participa en la diferenciación,

crecimiento y prevención de apoptosis de células eritroides precursoras [38]. EPO se encuentra clasificada dentro de la familia de las citocinas clase I e inicia su señalización por la unión a su receptor [39].

El gen humano que corresponde a EPO contiene 5 exones que codifican para una proteína inmadura de 193 aminoácidos, la cual es cortada en la posición arginina 166 para crear una proteína madura de 165 aminoácidos [40]. Este gen, se encuentra en el cromosoma 7 en la posición q22 y hasta el momento solo se conoce una isoforma [41]. Entre las modificaciones postraduccionales que sufre esta proteína, se encuentra la glicosilación que pueden aumentar su peso total hasta 8 kDa. Los sitios de N-glicosilación son los residuos de asparagina 24, 38, 83 y un sitio de O-glicosilación en el residuo de serina 126 [40, 42]. La estructura proteica madura se estabiliza por dos puentes disulfuro que se establecen entre las cisteínas 7 y 161 y 29 y 33 [43]. Su expresión es regulada positivamente por la hipoxia a través de factores de transcripción como HIF-2, HNF-4 $\alpha$  y AP-1 [44-46].

El papel de EPO y de su receptor (EPOR) se sustenta en estudios realizados en ratones EPO<sup>-/-</sup> o EPOR<sup>-/-</sup>, los cuales mueren en etapas embrionarias debido a una anemia severa, malformaciones en corazón y defectos en la angiogénesis [39, 47]. En condiciones normales el sistema EPO/EPOR está involucrado en la angiogénesis fisiológica del tracto genital femenino durante el ciclo uterino, así como en el cierre de heridas. De esta manera participa en la proliferación y migración de células endoteliales [48, 49]. En el sistema nervioso central, EPO mejora la supervivencia neuronal, en el sistema cardiovascular protege a los miocitos contra

una herida isquémica, así como también protege del daño isquémico y tóxico al riñón [50].

EPOR es una proteína transmembranal de 508 aminoácidos con un peso aproximado de 55 KDa. Posee tres dominios: el dominio extracelular, de 251 aminoácidos, formado por 2 regiones en forma de "L" denominadas D1 y D2 y conformadas por siete cadenas beta que al plegarse tienen una conformación de dos cadenas beta anti-paralelas alineadas 90° entre sí, así como una región similar a fibronectina tipo III. El dominio transmembranal posee 20 aminoácidos y el dominio citoplasmático 236 aminoácidos [51, 52]. El dominio citoplasmático posee residuos de tirosinas, que al fosforilarse pueden reclutar a diferentes proteínas cuya estructura contiene dominios SH2, capaces de reconocer tirosinas fosforiladas [53].

El gen de EPOR contiene 8 exones localizados en el cromosoma 19 en la posición p13.3-p13.2. Se han descrito tres isoformas, generadas por "splicing" alternativo; 1) proteína completa transmembranal funcional, 2) proteína trunca de 328 aminoácidos, la cual se encuentra anclada a la membrana, pero carece del dominio citoplasmático, por lo tanto no contiene tirosinas y no puede iniciar la señalización, 3) proteína soluble de 241 aminoácidos, que carece de dominio citoplasmático y transmembranal por lo que es incapaz de anclarse a la membrana plasmática y es secretado al medio [26, 54]. La proteína trunca y la soluble son consideradas reguladores negativos de la forma completa del receptor [43]. Durante las modificaciones postraduccionales, la proteína puede ser glicosilada o fosforilada, para generar una proteína de entre 66 y 105 kDa [51].

EPOR, en su extremo amino terminal en el dominio D1, posee 4 residuos de cisteína que le permiten estabilizar el homodímero y en D2 una secuencia altamente conservada WSXWS (triptófano-serina-X-triptófano-serina). Se propone que esta secuencia es necesaria para el plegamiento correcto en el retículo endoplásmico y la expresión correcta del receptor en la superficie celular [55]. En el extremo citoplásmico, contiene dos dominios hidrofóbicos denominados (Caja1) y (Caja2), los cuales son necesarios para la transducción de señales [56]. En la región juxtamembranal existe una asociación con la proteína tirosina cinasa del tipo no receptora JAK2 que es la encargada de fosforilar los residuos de tirosina del receptor [57]. Al unirse la molécula de EPO con su receptor EPOR, ocurre un cambio conformacional que a su vez provoca modificaciones sobre la estructura de la proteína JAK2, la cual se activa, subsecuente a su autofosforilación y es capaz de fosforilar los residuos de tirosina del dominio citoplásmico del receptor, creando sitios de unión para proteínas mediadoras, las cuales poseen en su estructura dominios SH2 que reconocen tirosinas fosforiladas y son capaces de activar diferentes vías de señalización como STAT5, MAPK (vías de acción mitogénica) y PI3K (anti-apoptótica) [39, 58]. Como un mecanismo de autorregulación, la fosforilación del receptor también recluta fosfatasa y proteínas supresoras de la señalización por citocinas como SOCS-1, SOCS-2 y SHP1, los cuales son capaces de bloquear la señalización [39, 57].

La expresión de EPOR no se encuentra limitada al linaje hematopoyético, encontrándose en diferentes tejidos como cerebro, corazón, hígado, tracto genital femenino, placenta, riñón e intestinos entre otros [48]. Con respecto al cáncer

mamario, Acs y colaboradores (2001), describen por primera vez un incremento en los niveles del receptor en muestras de pacientes con cáncer de mama y en algunas líneas celulares, de las cuales se hipotetiza un mecanismo parácrino para mantener la proliferación celular [59-61]. La función de EPOR en estos tejidos y líneas celulares no está del todo descrita. Se ha propuesto que en células tumorales actúa como agente protector del tumor, puesto que esta relación no siempre lleva a un aumento en la proliferación, sino a un incremento en la resistencia de células tumorales a diferentes terapias [62]. No obstante, se ha descrito que en células de cáncer de riñón, células escamosas de cabeza y cuello, líneas celulares de cáncer cervical y células de glioma, la señalización de EPOR se asocia a proliferación a través de la vía JAK2/STAT5, o al incremento en la expresión de ciclina D1 y la inhibición en la expresión de p21<sup>cip1</sup> y p27<sup>kip1</sup> [63, 64]. Así mismo, se ha reportado un aumento en el nivel de RNA mensajero de EPOR cuando el nivel de ERBB2 incrementa [65].

Yasuda y colaboradores (2003), proponen que la inhibición de la señalización de EPO/EPOR resulta en la disminución y/o destrucción de la vascularización en cáncer de útero y ovario. Así mismo, se ha observado que el uso de un anticuerpo dirigido al bloqueo de la fosforilación de STAT5, inhibe la angiogénesis y disminuye la supervivencia de células tumorales en coriocarcinoma de estómago y melanoma [66]. Por otra parte, Arcasoy y colaboradores (2005), proponen que el bloqueo de EPOR o el uso de inhibidores para JAK2 resultan en una importante disminución en el tamaño del tumor en un modelo de adenocarcinoma mamario de rata [67]. Batra y colaboradores en 2003, demostraron el incremento en la expresión de genes

antiapoptóticos (*bcl-x<sub>L</sub>*, *bcl-2* y *mcl-1*), y en la actividad de unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B al DNA en líneas celulares de neuroblastoma y en tumores de la familia del sarcoma de Ewing que expresaron EPOR y fueron tratados con EPO. El incremento en la expresión de genes se ha relacionado con la secreción de citocinas proangiogénicas, que promueven la proliferación y la quimiotaxis en células endoteliales [68].

### **III.VI.- Transición epitelio-mesénquima**

La principal causa de muerte en personas con cáncer es el desarrollo de metástasis [1, 2]. Con el fin de entender este proceso, se ha enfatizado el interés en definir la EMT, que incluye una serie de eventos en los que las células del tumor primario, pierden las uniones celulares, modifican su entorno, migran e invaden órganos distantes [69].

La EMT es un conjunto de características físicas y celulares que tienen como propósito principal promover la motilidad celular. Este evento puede ocurrir tanto de manera fisiológica como patológica y se encuentra clasificado en tres tipos [70]:

- Tipo 1: Procesos de embriogénesis.
- Tipo 2: Procesos de cierre de heridas.
- Tipo 3: Procesos neoplásicos.

La promoción de este evento es acompañado por la pérdida de la polaridad celular y uniones adherentes [71], así como la disminución en la expresión de proteínas características de células epiteliales como E-cadherina, claudinas, cateninas, ocludinas, desmoplaquinas y citoqueratinas como la 8 y 18; al tiempo que inician la

expresión de proteínas presentes en células mesenquimales como N-cadherina, vimentina, fibronectina, desmina y metaloproteinasas de matriz (MMPs) como la 2 y la 9 [72, 73]. Así mismo, se presenta un incremento en la expresión de factores de transcripción como Snail1, Snail2, Twist1, Twist2, ZEB1 y Sip1 que conllevan a la reorganización del citoesqueleto [74]. En este último evento participan proteínas como FAK, Src y algunas GTPasas para la formación de protrusiones de membrana llamadas lamelipodios y filopodios, así como fibras de estrés y renovación de adhesiones focales [75]. El conjunto de todos estos eventos le dan a las células la capacidad de migrar, fijarse a capas endoteliales entrar al torrente sanguíneo y/o linfático (intravasación), sobrevivir en la circulación, salir de la circulación (extravasación) y posteriormente, mediante un proceso inverso de transición mesénquima epitelio, colonizar nuevos órganos (metástasis) [76].

La degradación de la matriz extracelular (ECM) es crucial para el crecimiento tumoral, invasión, metástasis y angiogénesis. En este evento participan enzimas pertenecientes a la familia de endopeptidasas dependientes de zinc, cuya función principal es degradar componentes de la ECM, regular vías de señalización mediante la liberación de otros sustratos anclados a la matriz, como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento; siendo la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) y la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) las más importantes [77]. Estas MMPs se encuentran desreguladas en procesos cancerosos. Su principal sustrato es el colágeno tipo IV, la cual es el principal componente de la EM y es la primera barrera a la cual se encuentran las células tumorales para iniciar la invasión. De

esta manera, estas MMPs se convierten en un blanco de estudio en el cáncer de mama [78].

La expresión diferencial de proteínas está dirigida por algunos factores de transcripción, los cuales promueven la adquisición del fenotipo mesénquimal en células epiteliales. Entre los principales factores de transcripción involucrados se encuentra NF- $\kappa$ B, el cual dirige la expresión de otros factores principalmente involucrados en la represión de proteínas características de células epiteliales, algunos de ellos son Snail1, Snail2, Twist1, Twist2, ZEB1 y ZEB2 [72, 79].

### **III.VII.- Migración celular FAK y Src**

La migración celular es un evento importante tanto para procesos fisiológicos como embriogénesis, respuesta inmune, regeneración de tejidos y para procesos patológicos como artritis, osteoporosis y metástasis [80]. Este proceso involucra una serie de eventos que conllevan a la remodelación del citoesqueleto, dándose como respuesta a señales extracelulares como factores de crecimiento, hormonas, citocinas, etc [81]. Algunas proteínas directamente relacionadas con la migración celular son las tirosina cinasa FAK y Src, así como pequeñas GTPasas monoméricas de la familia de Rho [82]. En células cancerosas se ha observado que existe una sobreexpresión de estas proteínas tirosina cinasa, las cuales incrementan la actividad motora de la célula [75, 80]. Por otra parte, existen reportes en los que se menciona que proteínas oncogénicas como Src y Ras promueven la EMT [83]. Src es una proteína tirosina cinasa del tipo no receptora que colocaliza con E-cadherina en las uniones de células epiteliales [76]. En condiciones normales, se propone que Src estabiliza las uniones célula-célula regulándolas de manera



positiva, su delección provoca anormalidades en la arquitectura de la piel, consistentes con una mala formación de uniones adherentes y su sobreexpresión desestabiliza las uniones celulares, regulándolas de manera negativa [84, 85]. En células KM12C derivadas de metástasis colorrectal, se observó la expresión constitutiva de Src activo. Esta sobreexpresión, no causó efecto sobre el crecimiento celular, sin embargo, indujo EMT [86, 87]. Específicamente, la desregulación inducida por Src de E-cadherina requiere la señalización de integrina  $\alpha\beta1$  y la fosforilación de tirosina dependiente de Src en FAK para protrusiones periféricas dependientes de integrina, demostrando que la señalización Src-FAK promueve un cambio en el tipo de adhesión, desde adhesiones mediadas por cadherina a adhesiones mediadas por la integrina, promoviendo un fenotipo más motil [85, 88]. FAK se ha propuesto como un regulador negativo de las uniones célula-célula mediadas por E-cadherina. Datos recientes muestran que una desregulación de esta cinasa y la inhibición de su señalización, promueve el ensamble de uniones celulares mediadas por cadherinas [89]. En células HeLa la pérdida de FAK o de paxilina, promueve la formación de bordes celulares aberrantes, mientras que en caso contrario, la activación de FAK promueve la activación de Rac1 a través del complejo p130Cas/CrkII/DOCK180 y así potenciar la formación de lamelipodios en el borde celular [90].

### **III.VIII.- Cadherinas**

Uno de los cambios más característicos entre células epiteliales y mesenquimales es la expresión diferencial de cadherinas, las cuales son proteínas transmembranales que poseen en la parte extracelular cinco dominios de unión a

calcio, indispensables para que la interacción con su homóloga de la célula vecina se lleve a cabo [91]. Esta interacción extracelular le confiere rigidez a la unión, mientras que en la parte citoplásmica existe una asociación con cateninas como la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , para interactuar con los filamentos de actina, de esta manera participan en la adhesión celular, señalización y en la diferenciación de tejidos mediante el recambio entre ellas [92]. Las cadherinas más conocidas como clásicas son la E, P y N y el recambio entre la E-cadherina y la N-cadherina, ha sido ampliamente estudiado en EMT convirtiéndose en uno de los puntos clave de este proceso [91, 93]. En la glándula mamaria, las células luminales se comunican con la célula adyacente mediante uniones celulares mediadas por E-cadherina. Sin embargo, se ha reportado que hay una subexpresión o pérdida de E-cadherina en células de cáncer de mama lobulares invasivas [93]. A su vez, una alta expresión de esta proteína está correlacionada con un fenotipo no invasivo [94]. Por otra parte, estudios recientes han reportado que el cambio de cadherinas epiteliales (E-cadherina) por mesenquimales (N-cadherina) confieren mayor motilidad a la célula, lo que se traduce en la adquisición de un fenotipo más agresivo de la enfermedad [95].

### **III.IX.- Filamentos Intermedios**

La expresión de filamentos intermedios entre células epiteliales y mesenquimales es diferencial, en células de epitelio mamario se expresan las citoqueratinas 8 y 18; mientras que en células mesenquimales, la vimentina es el principal filamento intermedio expresado. Esta expresión diferencial le proporciona a la célula diferentes propiedades, por ejemplo E-cadherina es transportada a la membrana

por citoqueratinas y no por vimentina [96, 97], mientras que vimentina está asociada a proteínas de andamio, motoras y algunas ciasas; confiriéndole a la célula flexibilidad y resistencia a apoptosis [97-99]. Históricamente los filamentos intermedios han sido utilizados para ser marcadores de tejido y más recientemente su expresión diferencial ha sido involucrada como marcadores del proceso de EMT [100].

### **III.X.- Metaloproteinasas de matriz**

Subyacente al epitelio se encuentra la BM, la cual es una continuación de la ECM y está constituida por proteínas como elastina, colágeno y fibronectina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos [101]. Cuando las células tumorales comienzan a migrar, rompen la BM mediante la acción de proteínas como MMPs, destacando la MMP-2, MMP-8, MMP-9, ADAMs10 y 13. Así como se ha reportado un incremento en la expresión de la MMP-2, MMP-9 y de ADAMs10 en diferentes tipos de cáncer con pobre pronóstico [102, 103]. Las MMPs además de romper la BM, también contribuyen a la proliferación de células tumorales, ya que pueden modular la disponibilidad de algunos factores de crecimiento como los factores de crecimiento similares a la insulina y de ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico, liberándolos de la membrana celular y de la ECM [78]. Las MMP son requeridas para la degradación de la EM tanto en procesos fisiológicos como embriogénesis, cierre de heridas y patológicos como la invasión tumoral [104, 105]. La MMP-2 y la MMP-9 están implicadas en EMT, ya que como se ha reportado tienen como principal sustrato la colágena tipo IV, laminina y la parte extracelular de E-cadherina, su activación las convierte en las principales responsables de la

pérdida de las uniones adherentes [104, 105]. Por todo lo anterior son consideradas como blanco terapéutico en algunos tipos de cáncer. Estas endopeptidasas dependientes de zinc, son regulados post-transcripcionalmente, ya sea secretada como zimógeno o a través de su interacción con el inhibidor tisular de metaloproteinasa (TIMP) [106].

### **III.XI.- Factores de transcripción**

La mayoría de los tejidos y órganos adultos surgen a partir de una serie de conversiones de células epiteliales a células mesenquimales, a través de un proceso conocido como EMT y el proceso inverso transición mesénquima-epitelio. Las células epiteliales establecen contactos con las células vecinas mediante la disposición secuencial de uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas [107]. La conversión de células epiteliales a las células mesenquimales es fundamental para el desarrollo embrionario e implica profundos cambios fenotípicos que incluyen la pérdida de la adhesión célula-célula, la pérdida de polaridad celular y la adquisición de las propiedades migratorias e invasoras [108]. En esta serie de eventos se encuentran implicados algunos factores de transcripción capaces de iniciar y mantener este proceso. Dentro de los cuales, tenemos a la familia de Snail, conformada por dos miembros, Snail1 (Snail) y Snail2 (Slug), ambos se han visto que participan en la promoción de EMT durante el desarrollo embrionario, fibrosis y cáncer [109]. Estos factores reprimen la transcripción de genes epiteliales por su unión a secuencias de DNA denominadas cajas E, situadas en el promotor del gen de E-cadherina, a través de sus dominios de dedos de zinc en extremo carboxilo terminal [110]. Estos factores cooperan con otros reguladores transcripcionales,

como ocurre entre Snail1 y ETS1 el cual es activado por la vía de las MAPK para activar la expresión de MMP. También se ha visto una cooperación con los complejos SMAD3-SMAD4 activados por TGF- $\beta$  para reprimir a la E-cadherina y ocludinas. Snail1 puede ser fosforilado por GSK-3 $\beta$  en los residuos de serina 97 y 101 para ser exportado del núcleo o ser degradado por su fosforilación en los residuos de serina 108, 112, 116 y 120, esta fosforilación puede ser inhibida por la vía PI3K y WNT, debido a que bloquean la activación de GSK-3 $\beta$  promoviendo un incremento en la acción de Snail1 en el núcleo. PAK1 puede fosforilar a Snail1 en el residuo de serina 246 y LATS2 en el residuo de treonina 203 para incrementar su permanencia en núcleo y promover EMT [111, 112].

Dentro de la familia de factores de transcripción del tipo hélice-bucle-hélice básico (bHLH) tenemos a Twist1, Twist2, E42 y E12, que también tienen funciones de represión de genes de fenotipo epitelial y contribuir a la expresión de genes mesenquimales. En cáncer Twist1 reprime la expresión de E-cadherina e induce la expresión de N-cadherina de una manera independiente de Snail1 [110, 113]. Se ha reportado que Twist1 y Twist2 pueden formar homodímeros o heterodímeros con E12 o E47 y así regular la unión a las cajas E y la transcripción. La actividad de Twist1 puede ser influenciada por la vía de las MAPK que lo pueden fosforilar en el residuo de serina 68 y evitar su degradación por proteosoma, alargando su actividad [79].

Los dos miembros de la familia ZEB (ZEB1 y ZEB2) reconocen y se unen a las secuencias de cajas E para reprimir su transcripción, mediante la asociación con diversas proteínas como CTBP o p300/CBP pueden actuar como co-represores o

como co-activadores respectivamente [70]. La expresión de estos factores esta frecuentemente dada por la activación de Snail, pues en la región promotora de ZEB se encuentran sitios de unión a Snail1, adicionalmente también se ha reportado que Twist1 también participa en la expresión de ZEB, ambos casos en respuesta a la presencia del TGF- $\beta$  [113].

#### **IV.- Justificación**

La elevada mortalidad por cáncer de mama en México, es considerada como un problema prioritario de salud pública, ya que es la primera causa de muerte por tumor maligno en mujeres mayores de 25 años. Más del 50 % de los decesos son debidos al desarrollo de metástasis.

La anemia es un padecimiento fuertemente relacionado con el cáncer que empeora la calidad de vida del paciente y la eficacia del tratamiento, EPO es el inductor principal de eritrocitos, sin embargo, en pacientes tratados con EPO se ha observado que disminuye la supervivencia libre de enfermedad, y aumenta la tasa de mortalidad. Con base en estos resultados, diferentes agencias como la FDA entre otras, restringe el uso de EPO en este tipo de padecimientos y pide se indague sobre su efecto en células tumorales. Por tal motivo es de nuestro interés evaluar el papel de EPO en la progresión tumoral.

## **V.- Hipótesis**

La EPO promueve el cambio de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal en células epiteliales mamarias MCF10A.

## **VI.- Objetivos**

### **VI.I.- Objetivo general**

Determinar si la EPO induce EMT en células MCF10A.

### **VI.II.- Objetivos particulares**

- Evaluar si la EPO induce procesos de migración e invasión en la línea celular MCF10A.
- Determinar el efecto de la EPO sobre algunos marcadores epiteliales y mesenquimales relacionados con el proceso de EMT.
- Evaluar el efecto de la EPO sobre los factores de transcripción relacionados con EMT.
- Evaluar si la EPO induce activación de proteínas clave en la migración celular, como FAK y Src.
- Analizar la expresión diferencial de genes en células MCF10A estimuladas con EPO.



## VII.- Material y Métodos

Las cajas de Petri usadas para el cultivo celular, fueron de Corning Inc. (NY, USA), Eritropoyetina humana recombinante (EPO) fue obtenida de Probiomedic (México). Factor de crecimiento epidermal (EGF) fue obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Anticuerpo anti-E-cadherina 67A4, anti-vimentina V9, anti-N-cadherina 13A9, anti-Cinasa de adhesión focal (FAK) C-20, anti-Src N-16, anti-MMP-2 K-20, anti-MMP-9 H-129, anti-NF- $\kappa$ B p65 C-20 y anti- NF- $\kappa$ B p50 H-119, fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anticuerpos fosfoespecíficos anti-tirosina 397 de FAK (anti-p-FAK) y anti-tirosina 418 de Src (anti-p-Src), fueron obtenidos de Invitrogen (Camarillo, AC). Anticuerpo anti-actina fue amablemente proporcionado por el Dr. Manuel Hernández (Cinvestav-IPN). Isotopo radioactivo [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP se obtuvo de Perkin-Elmer (Boston, MA). Kit de extracción de RNA RNeasy QIAGEN (Hilden, Alemania), Tubos Amicon® Ultra-4 para filtración con centrífuga, EDM Millipore, Kit de inmunoprecipitación de cromatina el kit (Pierce™ Magnetic ChIP Kit, Thermo Scientific, USA). Kit iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA). cubreobjetos “chamber slides (Nalge, Nunc)”. Genechip Human Transcriptome Array 2.0. de Affymetrix (Santa Clara, California). Matrigel *BioCoat Matrigel Chamber* (BD Biosciences, Bedford, MA). Cámaras Boyden *BD®* con filtros de 8  $\mu$ m. Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) de Bio-Rad (Bio-Rad, USA). TriZol de Invitrogen (Carlsbad, California).

### Cultivo Celular

Se utilizó la línea celular MFC10A, crecida en una mezcla de medio (DMEM) Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12 3:1), suplementado con suero fetal bovino

(SFB) al 5%, 10 µg/ml de insulina 0.5 µg/ml de hidrocortisona, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF) recombinante y una mezcla de antibióticos, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C.

### **Estimulación celular con EPO y obtención de proteínas totales**

Una vez que las células alcanzaron la confluencia deseada, se les adicionó medio de ayuno DMEM/F12 (3:1), por 12 horas. Posterior al ayuno, las células fueron lavadas con PBS 1X y estimuladas con EPO en medio de ayuno a diferentes tiempos para cada ensayo. El estímulo se terminó por la aspiración de medio (medio condicionado) y las células fueron lisadas con 500 µl de amortiguador RIPA 1X (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 100 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, glicerol 10 %, Tritón X-100 1 %, desoxicolato de sodio 1 %, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, SDS 0.1 % y PMSF 1 mM) para la obtención de extractos de proteínas totales. Los lisados fueron centrifugados a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford.

### **Inmunodetección (Western blot)**

Las proteínas (40 µg) se separaron por SDS-PAGE al 8 o 10 % y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda (Bio-Rad). La membrana obtenida se tiñó con rojo de Ponceau para corroborar la transferencia de proteínas. Para evitar interacciones inespecíficas la membrana fue bloqueada usando leche semidescremada al 5 % en PBS 1X (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, con pH entre 7.2 a 7.4)/Tween 20 al 0.1% por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente, a una

concentración de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 4°C durante toda la noche, seguido de tres lavados de 5 minutos con PBS 1X/Tween 20 al 0.1 %. Para detectar la proteína de interés se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP), seguido de tres lavados de 5 minutos con PBS 1X/Tween 20 0.1%. Finalmente, las bandas fueron detectadas por autorradiografía usando un estuche de quimioluminiscencia. Las imágenes fueron analizadas por densitometría mediante el programa ImageJ (NIH, USA) y el promedio del análisis se graficó con el programa GraphPad Prism versión 6.0.

### **Ensayo de migración mediante cierre de herida (scratch)**

Los ensayos de cierre de herida fueron realizados en cajas para cultivo celular de 35 mm de diámetro y a 100% de confluencia. Las células fueron mantenidas en supresión de suero por 12 horas y dentro de las dos últimas horas de ayuno, las células fueron tratadas con mitomicina C 12  $\mu\text{M}$  con el fin de inhibir la proliferación celular. Posteriormente se realizó una rayadura a la monocapa de células con una punta de pipeta estéril de 200  $\mu\text{l}$  y se lavaron con PBS 1X (3 veces) para eliminar las células flotantes, se colocó el estímulo correspondiente de EPO a diferentes concentraciones (3,5,7 y 10 UI/ml) por 48 horas. Posterior al tiempo de estímulo, se aspiró el medio y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % y teñidas con cristal violeta al 0.1 % (p/v), ambos por 15 minutos. Finalmente, las células fueron fotografiadas al microscopio y analizadas con el programa Image J (NIH, USA) y el promedio de la intensidad media de fluorescencia sobre la rayadura se graficó con el programa GraphPad Prism versión 6.0.

### **Ensayo de invasión (Cámaras de Boyden)**

El ensayo de invasión celular fue realizado en cámaras de Boyden *BD®*, con filtros que poseen poros de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, los pozos fueron recubiertos con *Matrigel BioCoat Matrigel Chamber* (BD Biosciences, Bedford, MA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, cultivos confluentes de células MCF-10A fueron sometidas a supresión de suero por 12 horas. Posteriormente, las células fueron desprendidas con tripsina al 0.25 % (p/v) y verseno al 0.02 % (p/v), se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer para colocar 100,000 células en cada pozo, conjuntamente se colocaron las diferentes condiciones en la parte inferior de la cámara Boyden. A continuación, las células fueron incubadas por 48 horas en una atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, las células fueron fijadas con metanol frío durante 5 minutos para posteriormente remover, de la parte superior de la cámara, las células que no invadieron utilizando un hisopo de algodón. Una vez realizado este procedimiento, los insertos fueron teñidos con cristal violeta al 0.1% durante 10 minutos. Una vez teñidos los insertos, las membranas fueron solubilizadas con ácido acético al 10% y las células que invadieron se cuantificaron por absorbancia a 600 nm. Los resultados se graficaron como promedio de las absorbancias utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

### **Obtención de extractos nucleares**

Después del término de cada estímulo, las células fueron lisadas con 500  $\mu\text{l}$  de buffer hipotónico (Tris-HCl 10 mM pH 7.0, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  6 mM, NaF 3.2 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM). Los lisados fueron incubados por 10

minutos a 4°C, se les adicionó 5 µl de IGEPAL 10%, y se agitaron suavemente por 5 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 2600 rpm por 5 minutos conservando la pastilla (fracción nuclear) y desechando el sobrenadante (fracción citoplasmática). La pastilla fue lavada 2 veces con buffer hipotónico para eliminar residuos citoplasmáticos. Los extractos nucleares fueron obtenidos mediante la adición de 40 µl del buffer hipertónico (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 420 mM, glicerol al 20 %, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM) con agitación fuerte por 15 minutos a 4°C. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue recuperado correspondiendo a la fracción nuclear.

### **Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)**

Se utilizaron oligonucleótidos de doble cadena conteniendo el sitio específico para la unión de NF-κB (5'-AGCTAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGG-3'). Un total de 20 pmoles de la sonda fue marcada con ATP (γ-<sup>32</sup>P), usando la polinucleótido sintasa T4 [114]. Aproximadamente 1 pg del oligonucleótido marcado se adicionó con 5 µg de extracto nuclear en una mezcla de reacción conteniendo 3 µg de poli (dl-dC), HEPES 0.25 M pH 7.5, KCl 0.6 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 7.5 mM y glicerol al 9%. Como un control de especificidad, se utilizó un exceso de 100 veces de la sonda no marcada. Las muestras fueron separadas en geles de poli(acrilamida al 6% en buffer TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 0.5X, los geles se secaron y analizaron por autorradiografía.

### **Zimografía en gelatina**

Los cultivos confluentes de células MFC10A fueron privados de suero en medio de ayuno DMEM/F12 (3:1) por 12 horas previas al estímulo con EPO a diferentes tiempos. El medio condicionado fue recolectado y concentrado por centrifugación en tubos Amicon (Merck Millipore) con un peso molecular nominal límite de (5,000 NMWL) por 1.5 horas a 2500 rpm a 4°C. La actividad proteolítica fue analizada en los sobrenadantes usando geles de poliacrilamida (8%) copolimerizados con gelatina (1 mg/ml). Se mezclaron volúmenes constantes de sobrenadantes, con amortiguador de carga sin agentes reductores y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser resueltas por electroforesis a 4 °C. El gel se lavó 3 veces por 30 minutos con Triton X-100 al 2.5% a temperatura ambiente y se incubó en buffer de activación de metaloproteinasas durante 24 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo, el gel se tiñó con azul de Coomassie (Coomasie Brilliant Blue R-250) y la actividad proteolítica fue detectada como una banda clara correspondiente a gelatina digerida, en un fondo azul de gelatina sin digerir.

### **Aislamiento de RNA total y PCR tiempo real**

Los cultivos confluentes de la línea celular MFC10A bajo supresión de suero por 12 horas fueron estimulados con EPO durante seis horas. El RNA total fue obtenido usando el reactivo TriZol (Invitrogen), fue cuantificado y se determinó su pureza. La pureza mínima en la relación 260/280 fue de 1.9. La integridad se verificó la abundancia de las unidades ribosomales 28S y 18S y se analizó en un gel de agarosa desnaturizante al 1.5%. El cDNA se sintetizó, empleando un sistema de transcripción reversa SuperScript III usando 1 µg del RNA total como templado. Para

el PCR tiempo real, la expresión relativa del gen fue determinada usando el kit iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA). Los cebadores (primers) se muestran en la tabla 1 [115, 116]. Las condiciones de amplificación fueron los siguientes, 40 ciclos de 3 minutos a 95°C, 60 segundos a 60°C y 3 minutos a 72 °C. Los resultados fueron analizados por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , normalizado con  $\beta$ -actina [117].

➤ Tabla 1. Cebadores (Primers)

	<b>GEN FORWARD (5'→3')</b>	<b>REVERSE (5'→3')</b>
<i>Snail1</i>	GCGAGCTGCAGGACTCTAAT	CCTGTGTCCTCATCTGACA
<i>Snail2</i>	TTCGGACCCACCCATTACCT	TTGGAGCAGTTTTTGCCTG
<i>Twist1</i>	GGAGTCCGCAGTCTTCCGAG	GGAGGACCAGGTAGAGGAA
<i>Twist2</i>	AGCAAGAAGTCGAGCCAAGA	CAGCTTGAGCGTCTGGATCT
<i>ZEB1</i>	GCACAACCAAGTGCAGAAGA	CATTTGCAGATTGAGGCTGA
<i>E-Cadherina</i>	CGACCAACACAAGAATCTA	AGGCTGTGCCTTCCTACAGA
<i><math>\beta</math>-actina</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

### **Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

El ensayo fue realizado mediante el “kit” (Pierce™ Magnetic ChIP Kit, Thermo Scientific, USA) acorde al protocolo del fabricante. Células MCF10A privadas de SFB por 12 horas, fueron estimuladas con EPO por 3 y 6 horas. Las células fueron fijadas con formaldehído al 1 % por 10 minutos y la reacción se detuvo con la adición de glicina 1X por 5 minutos. Posteriormente, las células fueron lisadas con buffer de extracción de membrana y sonicadas para generar fragmentos de DNA entre 200-1000 pb. La habilidad de unión de las subunidades p65 y p50 de NF- $\kappa$ B al promotor

de Snail1, fue confirmada por inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos para cada una de las subunidades. Las regiones de DNA inmunoprecipitadas fueron amplificadas usando el kit iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA). Se utilizaron los “primers” anteriormente descritos por Lu y colaboradores (2012), sentido 5'-GCCTCGCTTCGCTCGACGTC-3' antisentido 5'-AGGCCACTCCCCGAGCAGGT-3'. [118]. Las condiciones empleadas para la amplificación fueron las siguientes: 5 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C, y 30 segundos a 72°C.

### **Microscopía confocal**

Células MCF10A fueron crecidas a 100 % de confluencia sobre cubreobjetos “chamber slides (Nalge, Nunc)”. Posteriormente las células fueron privadas de suero por 12 horas y en las últimas dos horas las células fueron tratadas con mitomicina C 12  $\mu$ M con la finalidad de inhibir la proliferación celular. Posteriormente se realizó una rayadura a la monocapa de células con la punta estéril de una pipeta de 200  $\mu$ l y se lavaron tres veces con PBS 1X para eliminar células suspendidas a consecuencia de la rayadura. Las células fueron estimuladas con EPO por 30 horas. Al término del estímulo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % (p/v) por 20 minutos, permeabilizadas con 1 % (v/v) Tritón X-100 por 20 minutos y bloqueadas por 1 hora con albumina de suero bovino al 3 % (p/v). Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-vimentina por 24 horas a 4°C. Las células fueron lavadas tres veces con PBS1X e incubadas con TRITC para teñir filamentos de actina y con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC por dos horas a temperatura ambiente. Vimentina y F-actina fueron analizados usando



un microscópio confocal marca Leica (Modelo TCS SP8; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Se tomaron secciones ópticas de 0.8-0.9  $\mu\text{m}$  de grosor tomando los ejes xyz y xzy. Las imágenes fueron analizadas usando el programa Image J software (NIH, USA).

### **Expresión génica por Microarreglos**

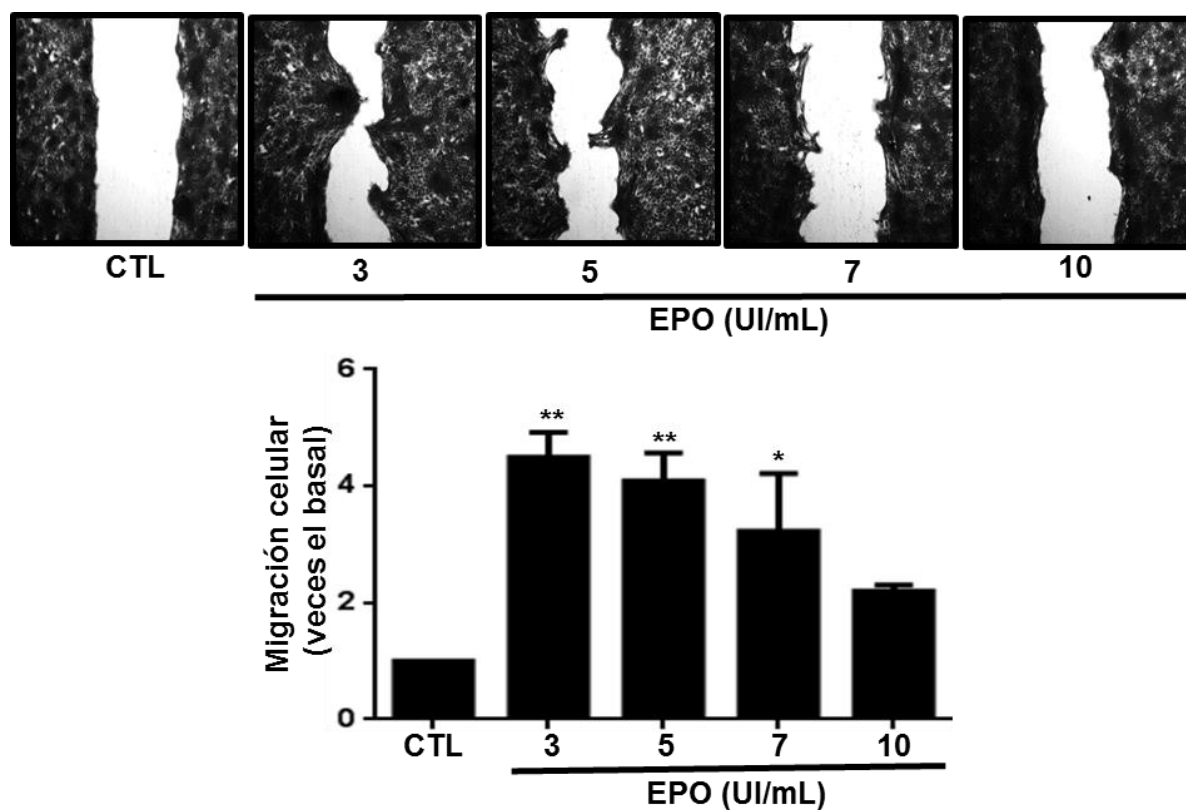
Células MCF10A fueron ayunadas por 12 h y estimuladas con EPO por 6 h. Al término del estímulo, el RNA se extrajo por medio de un kit comercial RNeasy de QIAGEN. Las muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo del fabricante. La integridad y pureza del RNA fue determinada por el análisis de absorbancia de la relación 260/280 y la integridad por la relación de las subunidades del RNA ribosomal 18S y 28S. Las muestras se sometieron al análisis por microarreglos, usando el Genechip Human Transcriptome Array 2.0. El análisis de datos se realizó a través de la consola TAC (Transcriptome analysis console) de Affymetrix, tomando en cuenta los genes diferencialmente expresados con al menos dos veces de cambio y una  $p < 0.05$ .

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados usando ANOVA de una vía y Dunnett's para una comparación múltiple. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  D.S. y la diferencia estadísticamente significativa fue considerada con una probabilidad de  $P \leq 0.05$ .

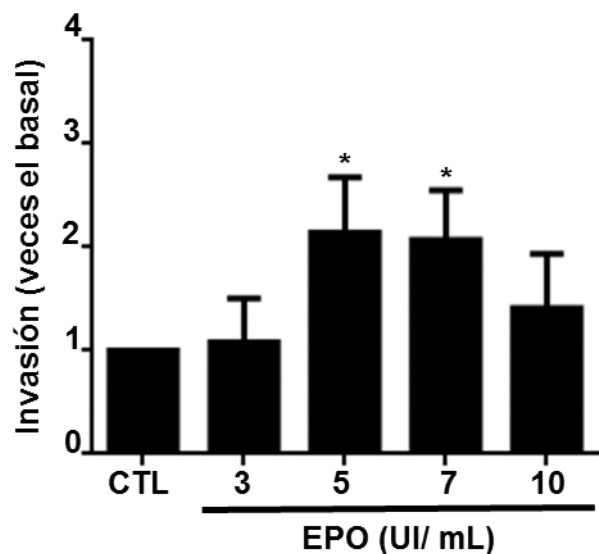
## VIII.- Resultados

Como primer punto, se evaluó la actividad de EPO en la inducción de la migración celular por medio de ensayo de cierre de herida. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas, posterior al tiempo de ayuno fueron estimuladas con EPO a diferentes concentraciones. Los resultados muestran que EPO induce migración celular observándose un punto máximo a las concentraciones de 3, 5 y 7 UI/ml (Fig. 1).



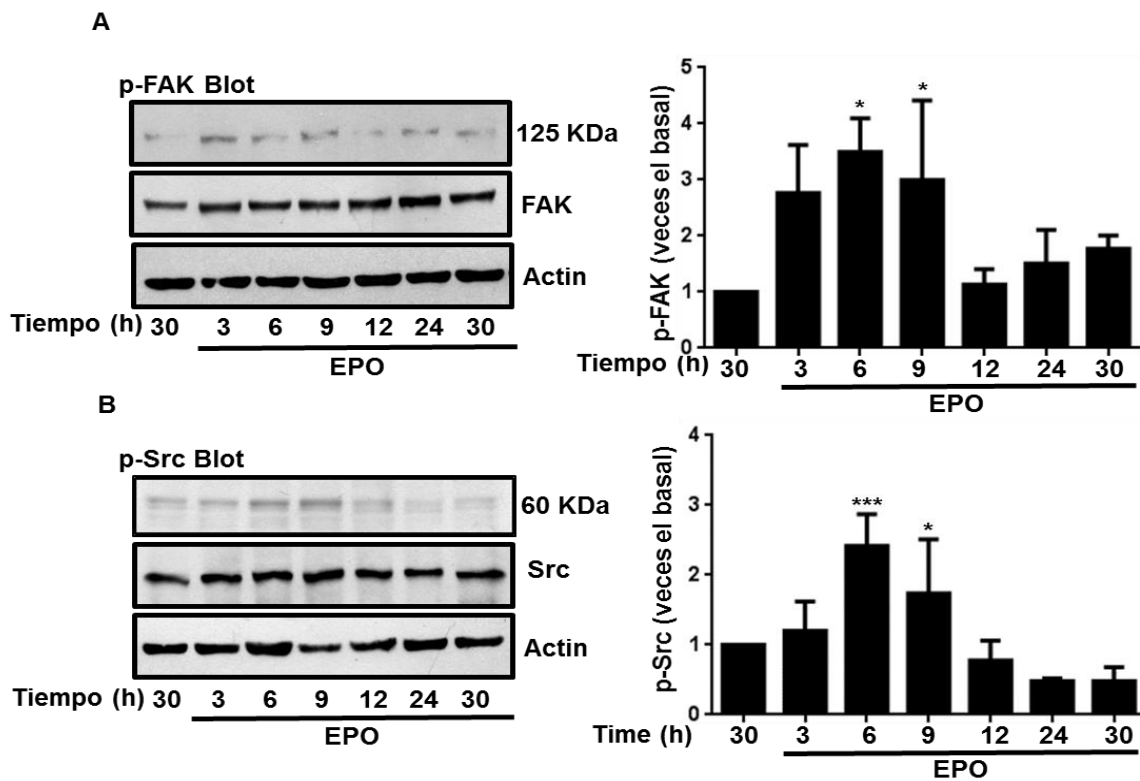
**Figura 1.** EPO induce migración en la línea celular de epitelio mamario MCF10A. Células MCF10A confluentes fueron ayunadas por 12 horas y tratadas con mitomicina C dos horas previas al término del ayuno. Posteriormente se realizó una rayadura en la monocapa celular con la punta estéril de una pipeta de 200  $\mu$ l. Las células fueron estimuladas con EPO a diferentes concentraciones (3, 5, 7 y 10 UI/ml) y se incubaron por 48 h. La imagen es representativa de tres experimentos independientes y la gráfica muestra el análisis estadístico de la intensidad media de fluorescencia que corresponde a las células presentes sobre la rayadura. El análisis se realizó con los programas ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Los resultados anteriores mostraron que EPO indujo migración en células MCF10A. Sin embargo, el efecto en el proceso de invasión celular se desconoce. Para analizar el efecto de EPO sobre este proceso celular, se realizaron ensayos de invasión en cámaras Boyden modificada con Matrigel. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas, posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones de EPO. Los resultados muestran incrementos estadísticamente significativos en la invasión celular en las concentraciones de 5 y 7 UI/ml con respecto a las células control (Fig. 2). Dado que el punto medio y constante en ambos ensayos fue la concentración de 5 UI/ml, se decidió utilizar esta concentración para ensayos posteriores. Los resultados anteriores demuestran que EPO está participando en la promoción del movimiento celular.



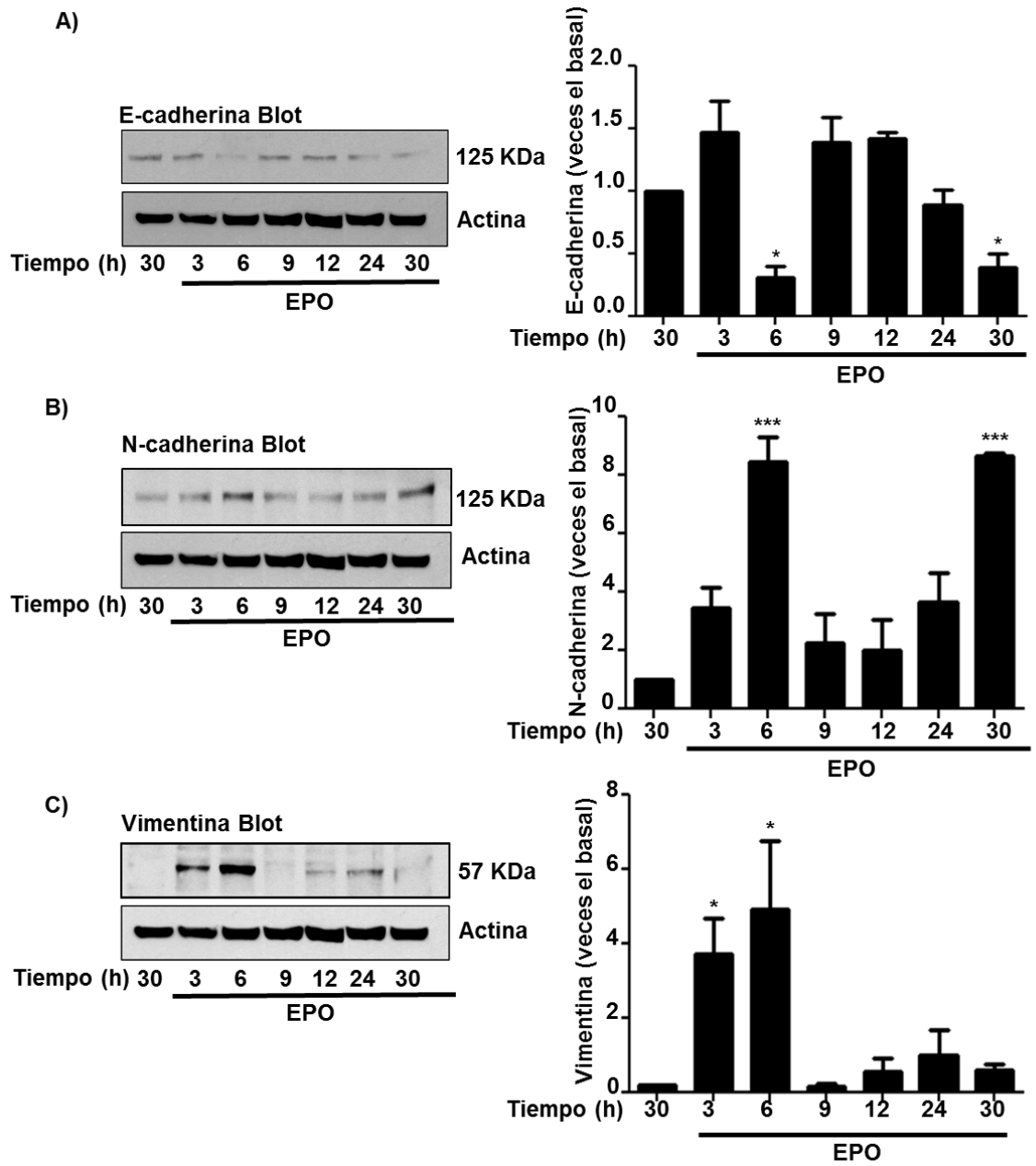
**Figura 2.** EPO induce invasión en la línea celular de epitelio mamario MCF10A. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas, estimuladas con diferentes concentraciones de EPO (3, 5, 7 y 10 UI/ml). Se colocaron 100, 000 células por pozo y se incubaron por 48 h. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 6.0. \* $p > 0.05$ .

Para evaluar la participación de FAK y Src, células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas. Posterior al tiempo de ayuno, las células fueron estimuladas con EPO (5 UI/ml) a diferentes tiempos. Al término de cada uno de ellos las células fueron lisadas y los extractos totales fueron analizados por WB. La activación de la proteína FAK es dada por la fosforilación de su residuo de tirosina 397. Como se muestra en la imagen (Fig. 3A), el punto máximo de fosforilación fue observado a las 6 y 9 h de estímulo. Por otro lado la activación para la proteína Src, se refleja por la fosforilación en el residuo de tirosina 418 (Fig.3B). Los resultados mostraron que los tiempos máximos de fosforilación de Src fueron a las 6 y 9 horas posterior al estímulo. El incremento simultáneo en la fosforilación de ambas proteínas, sugiere su participación en la formación de contactos focales.



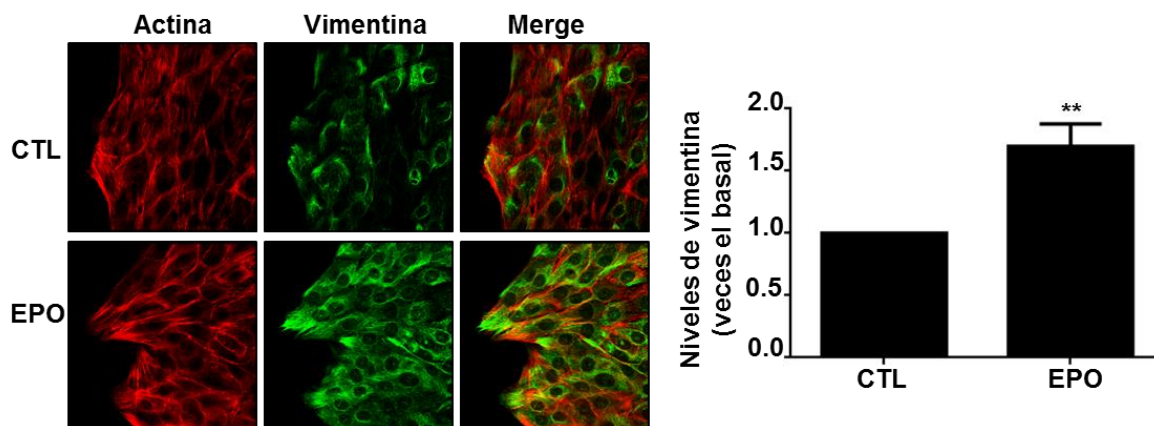
**Figura 3.** EPO induce la activación de FAK y Src en la línea celular MFC10A. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas, posteriormente estimuladas con EPO (5UI/ml) a diferentes tiempos, al término de cada uno de ellos las células fueron lisadas y los extractos totales fueron analizados por WB. Utilizando un anticuerpo anti-FAK (p-Tyr397) y anti-Src (p-Tyr418). Como controles de carga se usaron los anticuerpos anti-FAK, anti-Src totales y anti-actina. La imagen es representativa de tres experimentos independientes y la gráfica muestra el análisis estadístico de esos tres experimentos, el cual se realizó con el programa ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

A continuación evaluamos los niveles de expresión tanto de E-cadherina, N-cadherina y vimentina por medio de WB. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y posterior al tiempo de ayuno, las células fueron estimuladas con EPO (5 UI/ml) a diferentes tiempos. Al término de cada uno de ellos, las células fueron lisadas y los extractos totales fueron analizados. Por WB empleando anticuerpos anti-E-cadherina, anti-N-cadherina y anti-vimentina. Los resultados mostraron que los niveles de esta proteína disminuyen de manera significativa a las 6 y 30 horas (Fig. 4A). Por otro lado, el análisis de la proteína N-cadherina mostró un incremento significativo a las 6 y 30 horas con respecto al control (Fig. 4B), cabe mencionar que el incremento en los niveles de esta proteína son los mismos tiempos en los que la expresión de E-cadherina disminuyeron. Posteriormente, al evaluar los niveles proteicos de vimentina, se observó un incremento a las 3 y 6 horas (Fig. 4C).



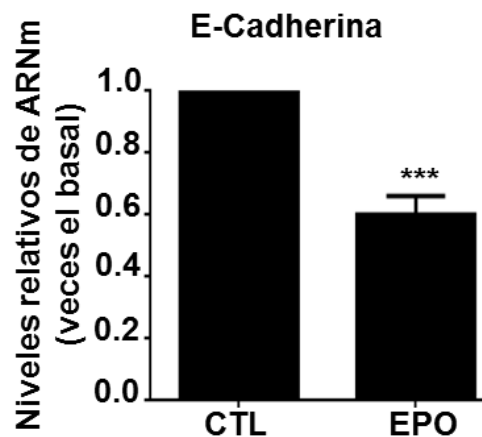
**Figura 4.** EPO induce un incremento de marcadores mesenquimales en células epiteliales mamarias MCF10A. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y posteriormente tratadas con EPO (5 UI/ml) a diferentes tiempos. Las membranas fueron reveladas con los anticuerpos anti-E-cadherina, anti-N-cadherina, anti-vimentina y anti-actina, este último como control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y las gráficas muestran el análisis estadístico de cada uno de los ensayos. El análisis densitométrico y estadístico se realizó con los programas ImageJ y GraphPad Prism 6, respectivamente. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Así mismo, se evaluó la expresión de vimentina en un ensayo de cierre de herida, el cual fue analizado por microscopía confocal. Células confluentes MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y pretratadas con mitomicina C dos horas previas al estímulo. Posteriormente las células fueron estimuladas con EPO por treinta horas, al término de la incubación, las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo anti-vimentina y con TRITC para visualizar filamentos de actina. Los resultados muestran que la expresión de vimentina se incrementa principalmente en los bordes de migración, mientras que en caso contrario en células anteriores al borde no hay expresión exacerbada de la proteína (Fig. 5).



**Figura 5.** EPO promueve sobreexpresión de vimentina en los bordes de migración. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y tratadas con mitomicina C en las dos últimas horas del tiempo de ayuno. Posteriormente se le realizó una rayadura a la monocapa de células con la punta estéril de una pipeta y fueron estimuladas con EPO (5UI/ml) por 30 horas. Al final del estímulo, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con un anticuerpo anti-vimentina y con TRITC. La imagen es representativa de tres experimentos independientes y la gráfica muestra el análisis estadístico de esos tres experimentos que fueron realizados con los programas ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. \*\* $p < 0.01$ .

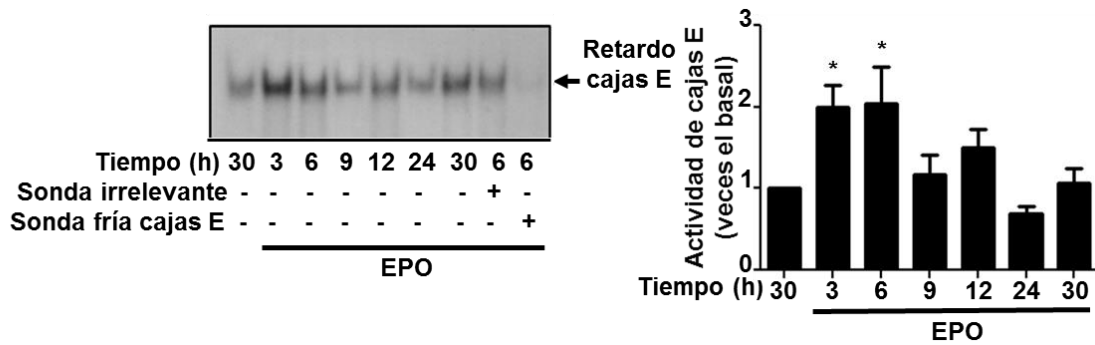
Los análisis obtenidos a nivel proteico, sugieren que EPO induce EMT en células MCF10A. Sin embargo, se desconoce si la desregulación de proteínas también está dada a nivel transcripcional. Por medio de RT-qPCR se evaluó los niveles de RNA mensajero de E-cadherina (Fig. 6). Células MCF10A ayunadas por 12 h y posteriormente estimuladas con EPO (5 UI/ml) por 6 horas. Al término del tiempo de estímulo las células fueron lisadas y el RNA total fue obtenido.



**Figura 6.** EPO desregula la transcripción de E-cadherina. Células MCF10A ayunadas por 12 horas fueron estimuladas con EPO (5 UI/ml) por 6 horas. Al término del estímulo se extrajo el RNA total. Se sintetizó el cDNA a partir de 1 µg de RNA total y se analizó por RT-qPCR. La gráfica muestra el análisis estadístico de tres experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ .

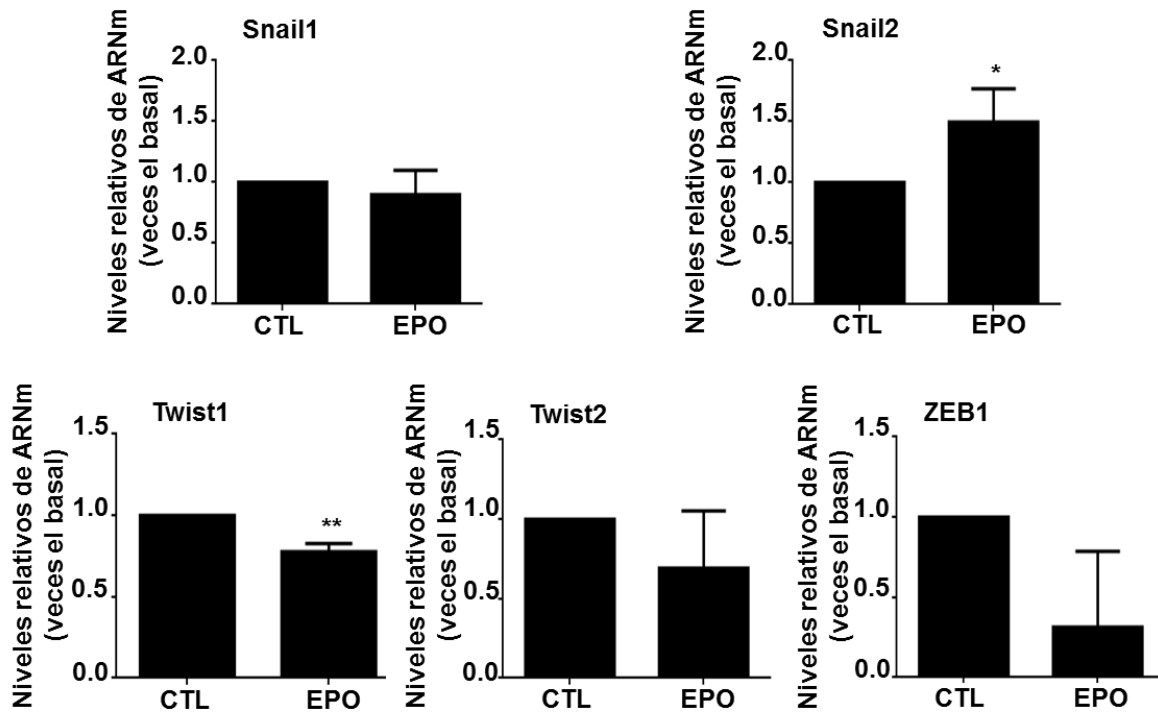
Para analizar las uniones de los factores de transcripción a las cajas E presentes en la región promotora del gen de E-cadherina, se analizó la interacción DNA/proteína por medio de ensayos de EMSA. Utilizando un oligonucleótido con una secuencia de reconocimiento de las cajas E, analizamos si EPO promovía la unión de algunos factores de transcripción al DNA. El oligonucleótido fue marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ .





**Figura 7.** EPO induce incremento en la actividad de interacción de cajas E con factores de transcripción. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y fueron estimuladas con EPO (5UI/ml) a diferentes tiempos. Al término de cada uno de ellos, se obtuvieron los extractos nucleares y se analizaron por EMSA. La imagen es representativa de tres experimentos independientes y la gráfica muestra el análisis estadístico de estos tres experimentos. El análisis densitométrico de los geles se realizó con el software ImageJ y el análisis estadístico de los mismos se realizó con el software GraphPad Prism 6. \* $p < 0.05$ .

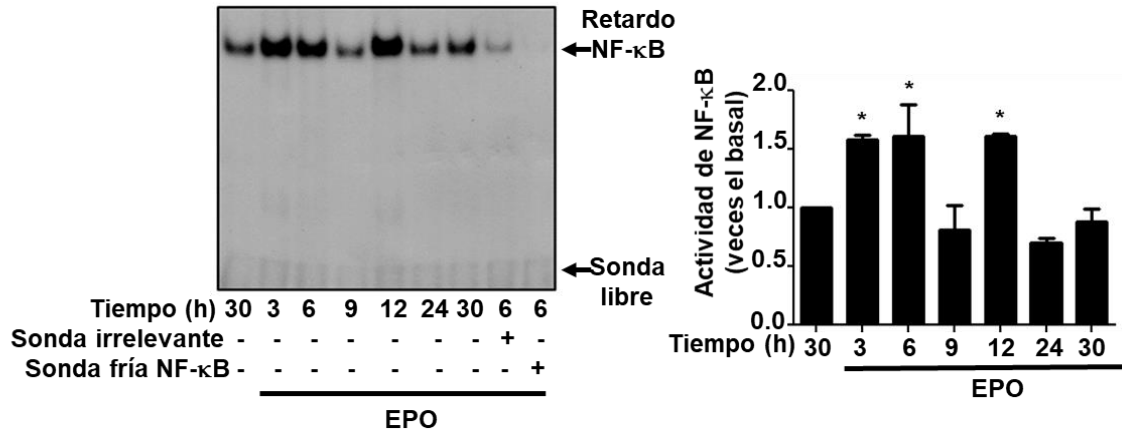
Los resultados mostraron un incremento significativo en la actividad de unión de los factores de transcripción a las cajas E a las 3 y 6 horas de estímulo. Los resultados sugieren que hay participación de los factores de transcripción catalogados como reguladores negativos del gen de E-cadherina (Fig. 7). Por ello, se analizaron los niveles de RNA mensajero de Snail1, Snail2, Twist1, Twist2 y ZEB1, los cuales, han sido reportados en la promoción de EMT [116].



**Figura 8.** EPO induce desregulación génica de factores de transcripción que participan en EMT. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y posteriormente estimuladas con EPO (5 UI/ml) por 6 horas. Posteriormente, las células fueron lisadas y el RNA fue extraído. Las gráficas muestran el análisis estadístico realizado con el programa GraphPad Prism 6 de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

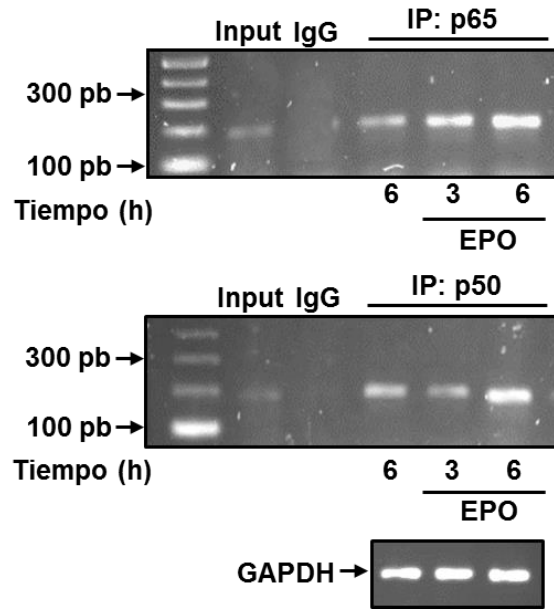
Los resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de RNA mensajero de Snail2, en contraste con una disminución significativa de Twist1. Los factores de transcripción como Snail1, Twist2 y ZEB1, permanecieron sin cambio (Fig. 8). Estos resultados sugieren la participación de Snail2 a las 6 h en células MFC10A estimuladas con EPO.

Por otro lado, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B está implicado en la regulación positiva de factores de transcripción que participan en al proceso de EMT [119].



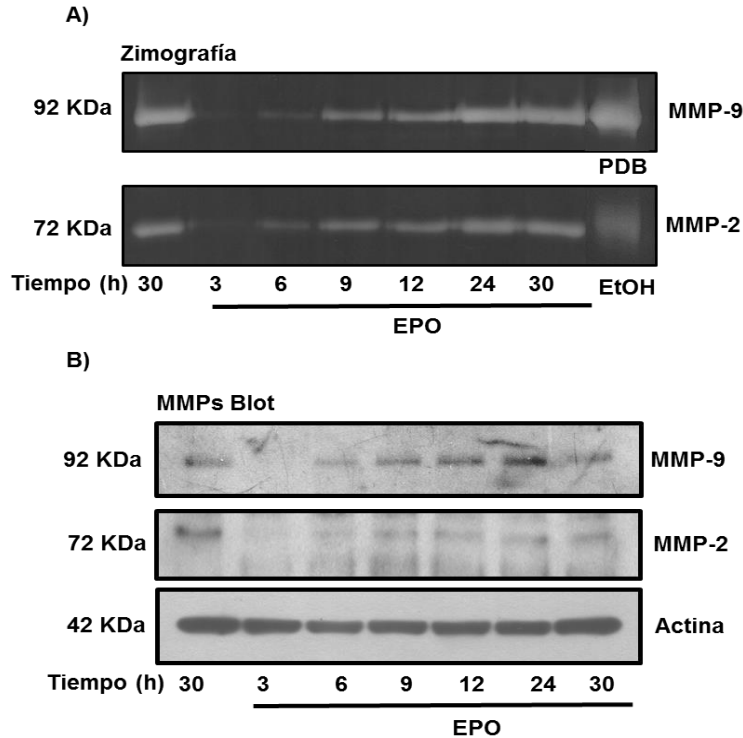
**Figura 9.** EPO induce incremento en la actividad de unión de NF-κB al DNA. Células MCF10A ayunadas por 12 horas fueron estimuladas con EPO (5UI/ml) por diferentes tiempos. Al término del estímulo, los extractos nucleares fueron obtenidos y analizados por EMSA. La imagen es representativa de tres experimentos independientes y la gráfica muestra el análisis estadístico de estos tres experimentos. El análisis densitométrico de los geles se realizó con el software ImageJ y el análisis estadístico de los mismos se realizó con el software GraphPad Prism versión 6.0. \*p<0.05.

Los resultados mostraron un incremento significativo en la actividad de unión de NF-κB al DNA en células MCF10A estimuladas con EPO por 3, 6 y 12 horas (Fig. 9). Con base en los resultados obtenidos en la actividad de unión de NF-κB y en los niveles de RNA mensajero, se realizó un ensayo de CHIP para NF-κB y uno de sus genes blanco, Snail1 (Fig. 10). Los resultados obtenidos en este último ensayo, sugieren que NF-κB participa en la transcripción de Snail1 en células MCF10A estimuladas con EPO a partir de las 3 horas alcanzando su máxima activación a las 6 horas para la subunidad p65; mientras que para la subunidad p50 solo se observó un incremento en la actividad de unión a las 6 horas. Estos resultados mostraron por primera vez, la participación del heterodímero p65 y p60 de NF-κB en este proceso.



**Figura 10.** NF- $\kappa$ B se une al promotor de Snail1. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y estimuladas con EPO (5 UI/ml) por 3 y 6 horas. Al término de cada tiempo, las células fueron fijadas, sonicadas y se realizó la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-NF- $\kappa$ B (p65) y anti-NF- $\kappa$ B (p50). Los fragmentos inmunoprecipitados fueron amplificados con una sonda específica para la región promotora del gen Snail1, Las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 1 %.

A continuación estudiamos si la EPO induce la secreción de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y estimuladas con EPO (5UI/ml) a diferentes tiempos. Al término de cada uno de ellos, las células fueron lisadas y el medio condicionado, fue concentrado y analizado por zimografía y por WB usando anticuerpos anti-MMP-2 y anti-MMP-9 (Fig. 11). Ambos ensayos muestran un incremento en la secreción de metaloproteinasas de una manera dependiente del tiempo en células MCF10A estimuladas con EPO.





**Figura 11.** EPO induce secreción de gelatinasas en células MCF10A. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y estimuladas con EPO (5UI/ml) a diferentes tiempos. Al término de cada uno de ellos se colectó el medio condicionado, se concentró y se analizó por zimografía (A) y por WB (B). Utilizando anticuerpos anti-MMP-2 y anti-MMP-9. Como control de carga, las células fueron lisadas y analizadas por WB con un anticuerpo anti-actina. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Ensayo de microarreglos se utilizó para obtener un perfil de la expresión de genes dado por el estímulo de EPO en células MCF10A, se utilizó la técnica de microarreglos empleando la versión GeneChip Human Transcriptome Array 2.0. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y estimuladas con EPO (5 UI/ml) por 6 horas. Al término del tiempo, las células fueron lisadas y el RNA total fue obtenido mediante el kit comercial RNeasy (QIAGEN). Las muestras fueron procesadas para microarreglos por la Unidad de Alta Tecnología (UAT) del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). El microarreglo utilizado fue el

GeneChip Human Transcriptome Array 2.0. Este chip analiza 285,000 transcritos, de los cuales 245,000 son transcritos codificantes y 40,000 no codificantes. Los resultados obtenidos, fueron analizados mediante el software Transcriptome Analysis Console (TAC) de Affymetrix. El criterio de inclusión de posibles candidatos a análisis para PCR, fueron aquellos que en su expresión tuvieron al menos dos veces de cambio o un “*fold change*” mínimo de 2 y una significancia de  $p < 0.05$ , tanto para la subexpresión como la sobreexpresión. La UAT realizó la validación del RNA como medida de control de calidad (Fig.12A). El mapa de calor muestra, de manera global por intensidad en color verde la subexpresión de genes, mientras que en color rojo muestra los genes sobreexpresados (Fig. 12B). La gráfica de volcano muestra, en puntos de color verde, los genes significativamente subexpresados y en color rojo los genes significativamente sobreexpresados (Fig. 12C.). De un total de 53,618 ID evaluados, solo 42 (0.07%) fueron diferencialmente expresados, de los cuales 26 se observaron subexpresados, mientras que 16 se observaron sobreexpresados. Sin embargo, el análisis en la base de datos mostró que de los ID subexpresados, solo 19 (0.03 %) correspondían a un gen reportado y para los sobreexpresados solo 10 (0.01 %)

A)

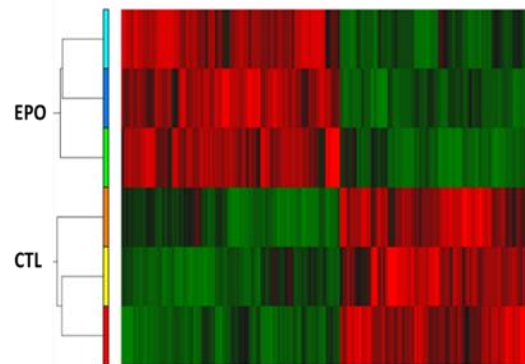



**RESULTADOS DE ANÁLISIS DE CALIDAD DE RNA**

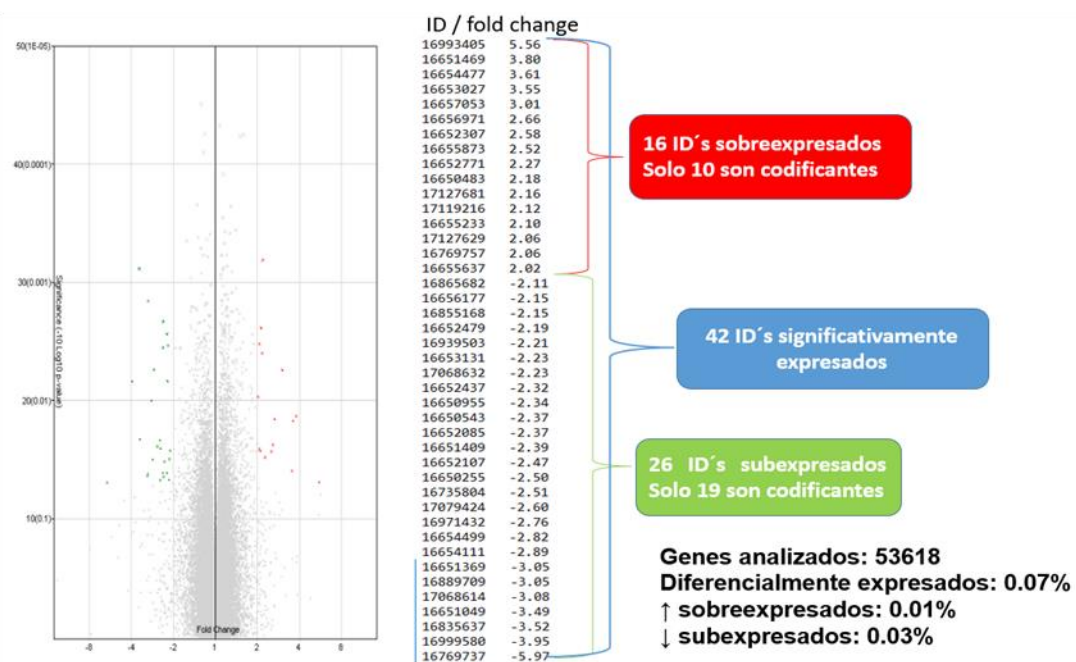
No de Servicio: U16\_058  
 Proyecto: Investigador Responsable: Dr. Julio Isael Pérez Carreón  
 Número de Muestras: 10  
 CHIP: Eukaryote Total RNA Nano  
 Fecha: 16 Junio 2016  
 RIN (RNA INTEGRITY NUMBER)

#	ID muestra	RIN	IRNA (Q21)	260/280	260/230	Observaciones
1	1	9.20	103.53	2.07	1.76	
2	1.1	9.30	107.97	1.99	1.94	
3	2	9.30	106.17	1.99	1.94	
4	2.2	9.40	109.67	1.98	2.2	
5	3	N/A	80.47	2.13	1.77	Señales inesperadas, RIN estimado por comparación no menor a 8
6	3.3	N/A	70.61	2.09	1.99	Señales inesperadas, RIN estimado por comparación no menor a 8
7	4	9.40	124.58	1.99	2.14	
8	4.4	9.40	81.82	1.96	1.96	
9	5	9.50	82.97	1.95	2.03	
10	5.5	9.40	82.73	2	2.05	

B)

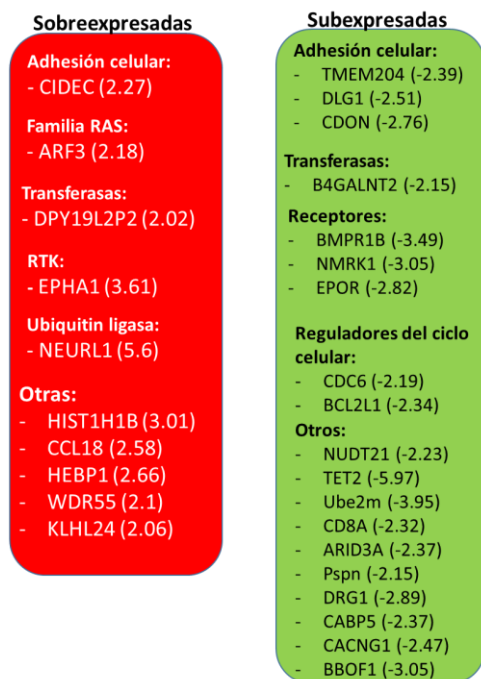


C)



**Figura 12.** Expresión génica diferencial de células MCF10A tratadas con EPO. Células MCF10A fueron ayunadas por 12 horas y estimuladas con EPO (5UI/ml) por 6 horas. Al término del estímulo las células se lisaron y se extrajo el ARN, se analizó en un microarreglo GeneChip Human Transcriptome Array 2.0. A) Análisis de validación de integridad y pureza del ARN. B) Mapa de calor de células control y estimuladas con EPO. La intensidad de color muestra el nivel de subexpresión (rojo) y sobreexpresión (verde). C) Gráfica de volcan e ID de genes sobreexpresados (rojo) y subexpresados (verde), Las imágenes muestran tres experimentos independientes. ID; número de identificación en la base de datos.

Con base en lo anterior proponemos que la EMT se encuentra regulada principalmente por cambios a nivel proteico, más que a nivel génico. Debido a que los ID diferencialmente expresados, codifican para proteínas que participan en diferentes procesos celulares (Fig.13).



**Figura 13.** Proteínas diferencialmente expresadas, en color rojo las proteínas sobreexpresadas y en color verde las proteínas subexpresadas. En paréntesis se muestra las veces de cambio.



## **X.- Discusión**

La anemia es una complicación frecuente en pacientes con cáncer. Se conocen diversos factores implicados en el desarrollo de la misma, estos pueden ser desde deficiencias nutricionales, reflejo propio del tumor tal como infiltración de la médula ósea, inflamación y pérdida de sangre, así como un efecto secundario de la terapia anti-cáncer [120]. Estudios epidemiológicos muestran que en pacientes recién diagnosticados con cáncer más del 50 % es detectado con un estado anémico. Se ha observado que dependiendo del tratamiento anti-cáncer que se administre como quimioterapia o radioterapia, el porcentaje de pacientes anémicos puede alcanzar el 100 %, [23, 121].

La anemia no solo deteriora la calidad de vida de los pacientes, sino también la eficacia del tratamiento. Puesto que algunas de las sintomatologías de la anemia son fatiga, mareo, náusea y presión arterial baja, el paciente se ve imposibilitado de realizar su rutina diaria de manera normal [122]. Diversos estudios muestran que el estado anémico limita la efectividad en el tratamiento, aumenta la tasa de recurrencia del cáncer, ineficacia y disminuye la tasa de supervivencia [25, 26]. Para contrarrestar el estado anémico, los pacientes son sometidos a transfusiones sanguíneas, lo cual incrementa el costo del tratamiento y la posibilidad de adquirir otro tipo de infecciones [21]. EPO es el principal agente estimulador de la eritropoyesis y comenzó a emplearse con la finalidad de incrementar los niveles de hemoglobina en pacientes anémicos [24]. Sin embargo, diversos estudios en diferentes cánceres, mostraron una baja supervivencia en pacientes tratados con EPO en comparación con aquellos pacientes que fueron tratados con placebo [37].

Bohlius (2006) y Bennett (2008) realizaron un meta-análisis poniéndose de manifiesto la baja supervivencia en pacientes tratados con EPO en diferentes tipos de cáncer [33, 35]. Con base en lo anterior, se restringió el uso de EPO en este tipo de padecimientos y comenzaron las investigaciones con el fin de evaluar su efecto sobre algunos tipos de cáncer. Cabe señalar que hasta el momento no se ha establecido un mecanismo el cual determine el efecto de EPO en células tumorales. Así mismo, no existe ningún reporte acerca del papel de EPO en el proceso de EMT. Por tal motivo, nuestro trabajo se centró en evaluar el papel de EPO en dicho proceso.

La EMT tiene como principales características que las células epiteliales pierdan polaridad celular y ganen la capacidad de migrar e invadir. Los resultados demuestran tras realizar una curva dosis respuesta en un ensayo de cierre de herida y en cámaras de Boyden modificadas con Matrigel, que EPO indujo significativamente migración e invasión celular respectivamente. En acorde a nuestros resultados, estudios realizados por Liang y colaboradores (2014) reportaron que EPO promueve migración e invasión en la línea celular de cáncer de seno SKBR3 [123]. Además, Fu y colaboradores (2009) demostraron que en la línea celular de cáncer de seno MCF-7 la sobreexpresión de EPOR promueve migración celular y Lester y colaboradores (2005) reportan en la misma línea celular que EPO promueve migración celular bajo condiciones de normoxia e hipoxia [124, 125]. Dado que este tipo de eventos incrementa la tasa de recambio de contactos focales, se evaluó por WB utilizando anticuerpos específicos para FAK y Src y analizando los sitios de autofosforilación de ambas cinasas. Este complejo participa

activamente en la renovación de contactos focales y rearreglo del citoesqueleto de actina [85]. Estudios previos demuestran que ambas cinasas no solo se encuentran sobre expresadas, sino también activas en muchos tumores [126, 127]. La participación de ambas proteínas está dada por un proceso de transfosforilación. La autofosforilación de FAK en su residuo de tirosina 397, expone un sitio SH2 de interacción para Src, al ocurrir esta interacción la cinasa Src se autofosforila en el residuo de tirosina 418, dando paso a la activación de su sitio catalítico que actúa sobre el resto de la estructura de FAK fosforilando diversos residuos de tirosinas, incluyendo las tirosinas 576 y 577 dentro del dominio catalítico de FAK y así, alcanzar su máxima activación [75]. Los resultados obtenidos, mostraron que EPO indujo fosforilación tanto de FAK en el residuo de tirosina 397, así como de Src en el residuo tirosina 418 de una manera simultánea a las 6 y 9 horas en células de epitelio mamario MFC10A. Por lo anterior, nosotros proponemos que el complejo FAK/Src está participando activamente en la migración celular, mediante el recambio de contactos focales. En acorde con nuestros resultados, estudios realizados en células de cáncer de colon KM12C presentan expresión constitutiva de Src, la cual no tiene efecto sobre proliferación celular, pero induce una EMT [87]. Debido a que EPO fue capaz de inducir migración, invasión y activación de proteínas cinasas, y estos eventos a su vez forman parte del proceso de EMT decidimos evaluar proteínas clave en un cambio de fenotipo epitelial a uno mesenquimal. Se evaluó los niveles proteicos y de RNA mensajero de E-cadherina por medio de WB y por RT-qPCR respectivamente. E-cadherina es una proteína transmembranal dependiente de  $Ca^{2+}$ , participa en las uniones célula-célula mediante la interacción en la parte extracelular con su homóloga de la célula vecina,

mientras que en la parte citoplásmica esta proteína interacciona con el citoesqueleto de actina a través de pequeñas proteínas citosólicas denominadas cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Este complejo proteico le confiere rigidez y estabilidad a la célula [128]. En la EMT, la pérdida de la expresión de esta proteína es un evento clave, debido a que los complejos proteicos en los cuales participan son desensamblados, provocando la degradación de la proteína y la modificación del arreglo cortical de actina para la formación de fibras de estrés [129]. La pérdida de E-cadherina es sustituida por N-cadherina, la cual está considerada un marcador molecular de células mesenquimales. Esta cadherina puede formar uniones con su homóloga de las células vecinas, sin embargo se ha reportado que esta unión es débil en comparación con la formada por su contraparte. Además, le permite adquirir afinidad por células mesenquimales, fibroblastos y células endoteliales. En la parte citosólica se asocia al citoesqueleto de forma similar que E-cadherina [95]. Por otra parte, también existe un recambio de expresión de los filamentos intermedios, donde citoqueratinas presentes en células epiteliales son sustituidos por vimentina, un filamento intermedio presente principalmente en células mesenquimales. Esta expresión diferencial de proteínas le confiere a la célula motilidad y resistencia mecánica [130]. En este trabajo, se demostró que EPO promueve una disminución de E-cadherina a nivel de RNA mensajero a las 6 horas, mientras que a nivel proteico la disminución se dio a las 6 y 30 horas. También, se observó a los mismos tiempos un incremento en la expresión proteica de N-cadherina. Por otro lado, la expresión proteica de vimentina mostró un incremento de este filamento intermedio en sincronía con el incremento en la expresión de N-cadherina y la subexpresión de E-cadherina a las 6 horas. Sin embargo, el incremento de vimentina no fue

observado a las 30 horas de estímulo, por lo cual se realizó una microscopía confocal que nos permitiera evaluar su expresión de esta proteína a las 30 horas de estímulo. Los resultados mostraron que la expresión de vimentina estaba dada principalmente en células situadas en el frente de migración, mientras que en células anteriores al borde la expresión fue menor. Estudios previos muestran que en células MCF7 transfectadas con el gen de vimentina, muestran una expresión del filamento por 5 horas aproximadamente y posterior a estas, la expresión disminuye, probablemente debido a la degradación [98]. Por todo lo anterior, nosotros proponemos que EPO está promoviendo un cambio en la expresión de cadherinas para la adquisición de un fenotipo mesenquimal. En apoyo a nuestros resultados Avizienyte y colaboradores (2002 – 2004) reporta que en células de cáncer de colon KM12C la participación de la señalización Src-FAK da como resultado expresión de vimentina, y cambios en el tipo de adhesión, disminuyen las adhesiones mediadas por cadherinas e incrementan las adhesiones mediadas por integrinas, promocionando un fenotipo más móvil [88, 131, 132].

Se ha descrito ampliamente que NF- $\kappa$ B regula directamente la expresión de algunos factores de transcripción involucrados en EMT [79]. Por medio de EMSA, se demostró que NF- $\kappa$ B incrementa su actividad de unión al DNA en células MCF10A estimuladas con EPO, con un máximo a las 6, 9 y 12 horas. Con base en este resultado y en los resultados anteriores, se observó que el incremento en la actividad de este factor, conserva los tiempos a los que se muestran cambios significativos en los diferentes procesos evaluados, lo que nos sugiere fuertemente

que EPO desencadena una serie de eventos para promover un cambio de fenotipo que le permita migrar e invadir.

Debido al incremento en la actividad de unión de NF- $\kappa$ B al DNA, se evaluó la actividad de interacción directa a uno de sus genes blanco como Snail1, el cual esta directamente relacionado con la EMT. Este interacción se evaluó mediante un ensayo de CHIP. Los resultados mostraron que existe un incremento en la unión de NF- $\kappa$ B (subunidad p50 y p65) a la región promotora de Snail1. Sin embargo, cabe mencionar que no se encontró aumento en los niveles de RNA mensajero a las 6 horas posteriores al estímulo con EPO para este factor de transcripción, por lo que proponemos que estos eventos no son simultáneos, en primer lugar podría estarse llevando un incremento en la unión de NF- $\kappa$ B al promotor de Snail1 y posteriormente si se evaluaran tiempos posteriores a 6 horas, se esperaría observar el incremento en los niveles de RNA mensajero de este factor. Hasta el momento este es el primer reporte que demuestra el incremento en la actividad de unión de la subunidades de p50 y p65 pertenecientes a NF- $\kappa$ B sobre el promotor del gen de Snail1 tras un estímulo de EPO en células epiteliales de mama MCF10A.

Posteriormente, se evaluó por EMSA la actividad de unión de algunos factores de transcripción que participan como reguladores negativos de E-cadherina al reconocer y unirse a las secuencias denominadas cajas E situadas en la región promotora del gen de E-cadherina como Snail1, Snail2, Twist1 y ZEB1 [110]. Los resultados demuestran por medio de RT-qPCR un incremento significativo en los niveles de RNA mensajero de Snail2, mientras que para Snail1, Twist2 y ZEB1 no se encontraron cambios significativos con respecto a las células no estimuladas con

EPO, cabe señalar que Twist1 mostro una disminución significativa. En acorde a la literatura, los resultados sugieren que los diferentes factores de transcripción que funcionan como represores del gen de E-cadherina actúan de manera diferencial durante el proceso de EMT [110]. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes previos de la actividad de unión de los factores de transcripción que participan en el proceso de EMT bajo un estímulo de EPO en células MCF10A. Cabe señalar que el tiempo al que se evaluaron los niveles de RNA mensajero de estos factores de transcripción, fue el mismo tiempo al que se observó la disminución de E-cadherina. Sin embargo no descartamos la posibilidad de la participación de los demás factores de transcripción a diferentes tiempos.

Dado que las células tumorales en su intento por invadir tejido circundante se ven obligadas a modificar su entorno, se han descrito mecanismos por los cuales las células secretan proteasas cuya función principal es romper proteínas blanco. La MMP-2 y MMP-9 han sido ampliamente descritas en procesos de invasión, debido a que una de sus principales proteínas blanco es la colágena tipo IV, siendo esta última el principal componente de la BM, la cual es la primera barrera física a la que se enfrentan las células tumorales en su proceso de invasión [133]. Estas proteínas son endopeptidasas dependientes de zinc, las cuales poseen una estructura general que le permite reconocer e interactuar con sus proteínas blanco. Sus principales regulaciones postranscripcionales, son de dos formas; por su interacción con su inhibidor TIMPs y por su secreción en forma de zimógeno [78]. Mediante ensayos de zimografía, se evaluó la capacidad de las células MCF10A para secretar MMPs tras un estímulo de EPO, Los datos muestran por primera vez que EPO fue

capaz de inducir la secreción de MMP-2 y de MMP-9 de una manera dependiente del tiempo alcanzando un máximo a las 24 horas. Los resultados fueron corroborados mediante WB observando la misma tendencia de los resultados obtenidos por zimografía.

En acorde con los resultados anteriores, se observó una sincronía en los tiempos de activación de los procesos celulares analizados. Se evaluó si esta serie de eventos estaba siendo regulada a nivel de genes. Por tal motivo se realizaron microarreglos. Los resultados obtenidos fueron escuetos a lo esperado, sin embargo permitió hipotetizar que los cambios observados en las células tras un estímulo de EPO estaban siendo dados principalmente a nivel proteico y no a nivel génico. Sin embargo, el análisis de identificación génica, arrojó posibles genes de interés debido a su interacción con los diferentes eventos que conforman en proceso de EMT.

## **XI.- Conclusión**

La participación de los eventos que conforman la EMT son de suma importancia para que células tumorales realicen metástasis. Ya que le permite a las células adquirir la capacidad de migrar e invadir. Nuestros resultados sugieren por primera vez que EPO está participando en la inducción del proceso de EMT, lo que conlleva a regular de manera positiva la progresión tumoral.



## XII.- Referencias

1. Salud, O.M.d.I., *Cancer* 2017.
2. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 563-72.
3. Palacio-Mejía, L.S., et al., *Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006*. *Salud Pública de México*, 2009. **51**(2): p. 12.
4. Sánchez, D.J.C., et al., *Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario*. Elsevier, 2013. **Quinta edición** p. 131.
5. Jéssica González Fernández, C.E.U.O., *LA GLÁNDULA MAMARIA, EMBRIOLOGÍA, HISTOLOGÍA, ANATOMÍA Y UNA DE SUS PRINCIPALES PATOLOGÍAS, EL CÁNCER DE MAMA*, in *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA*. 2012: Costa Rica. p. 317-320.
6. Macias, H. and L. Hinck, *Mammary gland development*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2012. **1**(4): p. 533-57.
7. Rodriguez Salas, N., E. Gonzalez Gonzalez, and C. Gamallo Amat, *Breast cancer stem cell hypothesis: clinical relevance (answering breast cancer clinical features)*. *Clin Transl Oncol*, 2010. **12**(6): p. 395-400.
8. Eroles, P., et al., *Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways*. *Cancer Treat Rev*, 2012. **38**(6): p. 698-707.
9. Quirós-Alpizar, J.L., et al., *Carcinomas invasores triples negativos de la glándula mamaria: incidencia y características clínico-patológicas (Triple-Negative Invasive Breast Carcinoma: Incidence and Clinical - Pathological Characteristics)*, in *Acta Médica Costarricense* 2010: [www.scielo.com](http://www.scielo.com). p. 6.
10. Pinder, S.E. and I.O. Ellis, *The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)--current definitions and classification*. *Breast Cancer Res*, 2003. **5**(5): p. 254-7.
11. Ramaswamy, S., et al., *A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*. *Nat Genet*, 2003. **33**(1): p. 49-54.
12. Paz, H., N. Pathak, and J. Yang, *Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis*. *Oncogene*, 2014. **33**(33): p. 4193-202.
13. Poste, G. and I.J. Fidler, *The pathogenesis of cancer metastasis*. *Nature*, 1980. **283**(5743): p. 139-46.
14. Torrades, S., *El origen genético del cáncer de mama*. Elsevier, 2003. **22**(6): p. 4.
15. Tovar-Guzman, V., et al., *Breast cancer in Mexican women: an epidemiological study with cervical cancer control*. *Rev Saude Publica*, 2000. **34**(2): p. 113-9.
16. Ansher, S.S. and R. Scharf, *The Cancer Therapy Evaluation Program (CTEP) at the National Cancer Institute*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001. **949**(1): p. 333-340.
17. Weiss, G., *Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease*. *Blood Rev*, 2002. **16**(2): p. 87-96.
18. Cella, D., *Factors influencing quality of life in cancer patients: anemia and fatigue*. *Semin Oncol*, 1998. **25**(3 Suppl 7): p. 43-6.
19. Bokemeyer, C., et al., *EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(15): p. 2201-16.
20. Smith, R.E., Jr., et al., *Darbepoetin alpha for the treatment of anemia in patients with active cancer not receiving chemotherapy or radiotherapy: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(7): p. 1040-50.

21. Gillespie, T.W., *Anemia in cancer: therapeutic implications and interventions*. *Cancer Nurs*, 2003. **26**(2): p. 119-28; quiz 129-30.
22. Demetri, G.D., *Anaemia and its functional consequences in cancer patients: current challenges in management and prospects for improving therapy*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(Suppl 1): p. 31-7.
23. Ludwig, H. and K. Strasser, *Symptomatology of anemia*. *Semin Oncol*, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 7-14.
24. Leonard, R.C., M. Untch, and F. Von Koch, *Management of anaemia in patients with breast cancer: role of epoetin*. *Ann Oncol*, 2005. **16**(5): p. 817-24.
25. Lee, W.R., et al., *Anemia is associated with decreased survival and increased locoregional failure in patients with locally advanced head and neck carcinoma: a secondary analysis of RTOG 85-27*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998. **42**(5): p. 1069-75.
26. Elliott, S. and A.M. Sinclair, *The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells*. *Biologics*, 2012. **6**: p. 163-89.
27. Vaupel, P., D.K. Kelleher, and M. Hockel, *Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy*. *Semin Oncol*, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 29-35.
28. Grossi, A., F. Balestri, and S. Santini, *Darbepoetin alpha in the treatment of cancer chemotherapy-induced anemia*. *Ther Clin Risk Manag*, 2007. **3**(2): p. 269-75.
29. Ludwig, H., et al., *The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(15): p. 2293-306.
30. Elliott, S., E. Pham, and I.C. Macdougall, *Erythropoietins: a common mechanism of action*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(12): p. 1573-84.
31. Leyland-Jones, B., *Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly*. *Lancet Oncol*, 2003. **4**(8): p. 459-60.
32. Henke, M., et al., *Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2003. **362**(9392): p. 1255-60.
33. Bennett, C.L., et al., *Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia*. *Jama*, 2008. **299**(8): p. 914-24.
34. Bohlius, J., et al., *Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(10): p. 708-14.
35. Bohlius, J., et al., *Recombinant human erythropoietin and overall survival in cancer patients: results of a comprehensive meta-analysis*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(7): p. 489-98.
36. Rizzo, J.D., et al., *Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the American Society of Hematology*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2303-20.
37. Aapro, M., et al., *Effect of once-weekly epoetin beta on survival in patients with metastatic breast cancer receiving anthracycline- and/or taxane-based chemotherapy: results of the Breast Cancer-Anemia and the Value of Erythropoietin (BRAVE) study*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(4): p. 592-8.
38. Elliott, S., et al., *Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate*. *Exp Hematol*, 2004. **32**(12): p. 1146-55.
39. Suzuki, N., H.Y. Mukai, and M. Yamamoto, *In vivo regulation of erythropoiesis by chemically inducible dimerization of the erythropoietin receptor intracellular domain*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119442.

40. Sasaki, R., S. Masuda, and M. Nagao, *Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. **64**(9): p. 1775-93.
41. Powell, J.S., et al., *Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6465-9.
42. Mulcahy, L., *The erythropoietin receptor*. Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 19-23.
43. Debeljak, N., P. Solar, and A.J. Sytkowski, *Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 563.
44. Moritz, K.M., G.B. Lim, and E.M. Wintour, *Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 2): p. R1829-44.
45. Jacobs-Helber, S.M., et al., *AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3699-707.
46. Jelkmann, W., *Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine*. Methods Enzymol, 2007. **435**: p. 179-97.
47. Um, M., A.W. Gross, and H.F. Lodish, *A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells*. Cell Signal, 2007. **19**(3): p. 634-45.
48. Farrell, F. and A. Lee, *The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues*. Oncologist, 2004. **9 Suppl 5**: p. 18-30.
49. Lombardero, M., K. Kovacs, and B.W. Scheithauer, *Erythropoietin: a hormone with multiple functions*. Pathobiology, 2011. **78**(1): p. 41-53.
50. Siren, A.L., et al., *Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 4044-9.
51. Syed, R.S., et al., *Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 511-6.
52. Wojchowski, D.M., et al., *Signal transduction in the erythropoietin receptor system*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 143-56.
53. Lowenstein, E.J., et al., *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 431-42.
54. Sinclair, A.M., et al., *Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients*. Cancer, 2007. **110**(3): p. 477-88.
55. Quelle, D.E., F.W. Quelle, and D.M. Wojchowski, *Mutations in the WSAWSE and cytosolic domains of the erythropoietin receptor affect signal transduction and ligand binding and internalization*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(10): p. 4553-61.
56. Pelletier, S., et al., *Two domains of the erythropoietin receptor are sufficient for Jak2 binding/activation and function*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8527-38.
57. Huang, L.J., S.N. Constantinescu, and H.F. Lodish, *The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor*. Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1327-38.
58. Wojchowski, D.M., P. Sathyanarayana, and A. Dev, *Erythropoietin receptor response circuits*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(3): p. 169-76.
59. Acs, G., et al., *Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3561-5.
60. Zhang, C., et al., *Erythropoietin receptor expression and its relationship with trastuzumab response and resistance in HER2-positive breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **136**(3): p. 739-48.

61. Arcasoy, M.O., et al., *Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer*. Lab Invest, 2002. **82**(7): p. 911-8.
62. Hedley, B.D., et al., *Recombinant human erythropoietin in combination with chemotherapy increases breast cancer metastasis in preclinical mouse models*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(19): p. 6151-62.
63. Richmond, T.D., M. Chohan, and D.L. Barber, *Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(3): p. 146-55.
64. Seubert, N., et al., *Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer*. Mol Cell, 2003. **12**(5): p. 1239-50.
65. Trost, N., et al., *Correlation between erythropoietin receptor(s) and estrogen and progesterone receptor expression in different breast cancer cell lines*. Int J Mol Med, 2013. **31**(3): p. 717-25.
66. Yasuda, Y., et al., *Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies*. Carcinogenesis, 2003. **24**(6): p. 1021-9.
67. Arcasoy, M.O., et al., *Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(1): p. 20-7.
68. Batra, S., et al., *Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival*. Lab Invest, 2003. **83**(10): p. 1477-87.
69. Nagi, C., et al., *N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant--invasive micropapillary carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2005. **94**(3): p. 225-35.
70. Kong, D., et al., *Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12445.
71. Nelson, W.J., *Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(1): p. a000513.
72. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 117-34.
73. Huang, R.Y., P. Guilford, and J.P. Thiery, *Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 19): p. 4417-22.
74. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol, 2006. **172**(7): p. 973-81.
75. McLean, G.W., et al., *The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(7): p. 505-15.
76. Patel, A., et al., *Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis*. Life Sci, 2016. **157**: p. 52-61.
77. Fata, J.E., Z. Werb, and M.J. Bissell, *Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(1): p. 1-11.
78. Gialeli, C., A.D. Theocharis, and N.K. Karamanos, *Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting*. Febs j, 2011. **278**(1): p. 16-27.
79. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
80. Webb, D.J., J.T. Parsons, and A.F. Horwitz, *Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(4): p. E97-100.
81. Machesky, L.M. and A. Hall, *Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization*. J Cell Biol, 1997. **138**(4): p. 913-26.

82. Ridley, A.J., *Rho GTPases and cell migration*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 15): p. 2713-22.
83. Soki, F.N., S.I. Park, and L.K. McCauley, *The multifaceted actions of PTHrP in skeletal metastasis*. Future Oncol, 2012. **8**(7): p. 803-17.
84. Calautti, E., et al., *Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion*. J Cell Biol, 1998. **141**(6): p. 1449-65.
85. Avizienyte, E. and M.C. Frame, *Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 542-7.
86. Irby, R.B. and T.J. Yeatman, *Role of Src expression and activation in human cancer*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5636-42.
87. Jones, R.J., et al., *Elevated c-Src is linked to altered cell-matrix adhesion rather than proliferation in KM12C human colorectal cancer cells*. Br J Cancer, 2002. **87**(10): p. 1128-35.
88. Avizienyte, E., et al., *Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 632-8.
89. Yano, H., et al., *Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion*. J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 283-95.
90. Cheresch, D.A., J. Leng, and R.L. Klemke, *Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells*. J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 1107-16.
91. Shapiro, L. and W.I. Weis, *Structure and biochemistry of cadherins and catenins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(3): p. a003053.
92. Halbleib, J.M. and W.J. Nelson, *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*. Genes Dev, 2006. **20**(23): p. 3199-214.
93. Cowin, P., T.M. Rowlands, and S.J. Hatsell, *Cadherins and catenins in breast cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 499-508.
94. Berx, G. and F. Van Roy, *The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression*. Breast Cancer Res, 2001. **3**(5): p. 289-93.
95. Nieman, M.T., et al., *N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 631-44.
96. Toivola, D.M., et al., *Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(11): p. 608-17.
97. Hanada, S., et al., *Keratin-containing inclusions affect cell morphology and distribution of cytosolic cellular components*. Experimental Cell Research, 2005. **304**(2): p. 471-482.
98. Mendez, M.G., S. Kojima, and R.D. Goldman, *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition*. Faseb j, 2010. **24**(6): p. 1838-51.
99. Suzuki, T., et al., *MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14933-41.
100. Kidd, M.E., D.K. Shumaker, and K.M. Ridge, *The Role of Vimentin Intermediate Filaments in the Progression of Lung Cancer*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(1): p. 1-6.
101. Rozario, T. and D.W. DeSimone, *The Extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View*. Dev Biol, 2010. **341**(1): p. 126-40.
102. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
103. Ruokolainen, H., P. Paakko, and T. Turpeenniemi-Hujanen, *Tissue and circulating immunoreactive protein for MMP-2 and TIMP-2 in head and neck squamous cell carcinoma-tissue immunoreactivity predicts aggressive clinical course*. Mod Pathol, 2006. **19**(2): p. 208-17.
104. Jacob, A. and R. Prekeris, *The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis*. Front Cell Dev Biol, 2015. **3**: p. 4.

105. Shah, P.P., M.Y. Fong, and S.S. Kakar, *PTTG induces EMT through integrin alphaVbeta3-focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(26): p. 3124-35.
106. Singh, D., et al., *Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs)*. *Front Mol Biosci*, 2015. **2**: p. 19.
107. Sanchez-Tillo, E., et al., *EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **69**(20): p. 3429-56.
108. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*, 2009. **139**(5): p. 871-90.
109. Whiteman, E., et al., *The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes*. *Oncogene*, 2008. **27**(27): p. 3875-9.
110. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(6): p. 415-428.
111. Yang, Z., et al., *Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3179-84.
112. Zhang, K., et al., *Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation*. *Embo j*, 2012. **31**(1): p. 29-43.
113. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition*. *Cell Res*, 2009. **19**(2): p. 156-72.
114. Hodgson, L., A.J. Henderson, and C. Dong, *Melanoma cell migration to type IV collagen requires activation of NF-kappaB*. *Oncogene*, 2003. **22**(1): p. 98-108.
115. Baranwal, S. and S.K. Alahari, *Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **384**(1): p. 6-11.
116. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(2): p. 76-83.
117. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
118. Lu, L., et al., *Gambogic acid inhibits TNF-alpha-induced invasion of human prostate cancer PC3 cells in vitro through PI3K/Akt and NF-kappaB signaling pathways*. *Acta Pharmacol Sin*, 2012. **33**(4): p. 531-41.
119. Huber, M.A., et al., *NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(4): p. 569-81.
120. Groopman, J.E. and L.M. Itri, *Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(19): p. 1616-34.
121. Coiffier, B., et al., *Predicting cancer-associated anaemia in patients receiving non-platinum chemotherapy: results of a retrospective survey*. *Eur J Cancer*, 2001. **37**(13): p. 1617-23.
122. Caro, J.J., et al., *Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review*. *Cancer*, 2001. **91**(12): p. 2214-21.
123. Liang, K., et al., *Autocrine/paracrine erythropoietin regulates migration and invasion potential and the stemness of human breast cancer cells*. *Cancer Biol Ther*, 2014. **15**(1): p. 89-98.
124. Lester, R.D., et al., *Erythropoietin promotes MCF-7 breast cancer cell migration by an ERK/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway and is primarily responsible for the increase in migration observed in hypoxia*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(47): p. 39273-7.
125. Fu, P., X. Jiang, and M.O. Arcasoy, *Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAP-kinase dependent pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **379**(3): p. 696-701.

126. Yin, B., *Focal adhesion kinase as a target in the treatment of hematological malignancies*. Leuk Res, 2011. **35**(10): p. 1416-8.
127. Zhang, S. and D. Yu, *Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(3): p. 122-8.
128. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
129. Gurzu, S., et al., *Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update*. World J Clin Cases, 2015. **3**(5): p. 393-404.
130. Gloushankova, N.A., S.N. Rubtsova, and I.Y. Zhitnyak, *Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells*. Tissue Barriers, 2017. **5**(3): p. e1356900.
131. Rengifo-Cam, W., et al., *Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis*. Oncogene, 2004. **23**(1): p. 289-97.
132. Avizienyte, E., et al., *Src SH3/2 Domain-mediated Peripheral Accumulation of Src and Phospho-myosin Is Linked to Deregulation of E-cadherin and the Epithelial-Mesenchymal Transition*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(6): p. 2794-803.
133. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.

### **XIII.- Anexo artículo**