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 cancerosas mamarias

Tesis que presenta:

Q.F.B. Dulce Lorena Medina García

Para obtener el Grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOLOGIA CELULAR

Directores de Tesis:

Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Dr. Julio Isaél Pérez Carreón

Ciudad de México, México Julio 2018

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.

He escrito para mí misma

Agradecimientos

Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

Al Dr. Julio Pérez Carreón por sus apreciados y relevantes aportes y críticas durante el desarrollo de esta investigación.

A mi sensei y amiga Alejandra, por toda su enseñanza dentro y fuera del laboratorio además de su paciencia, disposición y sobre todo por creer en mí.

A Ricardo, por todo su apoyo y enseñanza durante el desarrollo de mi proyecto.

A Julia por su apoyo durante el análisis de los microarreglos.

A Mario y Felipe, por hacer la investigación más divertida.

A mis sinodales: el Dr. Manuel Hernández Hernández y Antony Boucard Jr. Sugerencias y críticas constructivas.

Contenido

Abreviaturas 6

Relación de figuras 8

Resumen 9

Abstract 10

I. INTRODUCCIÓN 11

1.1. Glándula mamaria y cáncer de mama 11

1.2. Etiología del cáncer de mama 12

1.3. Anemia y cáncer 13

1.4. EPO y EPOR 15

1.5. Migración celular y FAK 16

1.6. Invasión celular 17

1.7. Metaloproteinasas de matriz 17

1.8. Transición epitelio-mesénquima 18

1.9. Cadherinas 19

II. JUSTIFICACIÓN 20

III. HIPÓTESIS 20

IV. OBJETIVO GENERAL 20

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

VI. MATERIAL Y MÉTODOS 21

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 24

VIII. RESULTADOS 24

IX. DISCUSIÓN 35

X. CONCLUSIÓN 39

XI. BIBLIOGRAFÍA 39

Abreviaturas

DCIS: Carcinoma ductal *in situ*

DCI: Carcinoma ductal invasivo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

TEM: Transición epitelio-mesénquima

EPO: Eritropoyetina

EPOR: Receptor de eritropoyetina

HIF-2: Factor inducible por hipoxia 2

HNF-4α: Factor nuclear de hepatocitos 4 alfa

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

MEC: Matriz extracelular

MMP-2: Metaloproteinasa de matriz 2

MMP-9: Metaloproteinasa de matriz 9

ARN: Ácido ribonucleico

TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteinasas

WB: Western blot

Relación de figuras

Figura 1. EPO promueve migración en la línea celular MDA-MB-231

Figura 2. EPO induce la activación de FAK en la línea celular MDA-MB-231

Figura 3. EPO promueve invasión en la línea celular MDA-MB-231

Figura 4. EPO induce secreción de gelatinasas en la línea celular MDA-MB-231

Figura 5. EPO promueve migración en la línea celular MCF7

Figura 6. EPO induce un decremento en la expresión de E-cadherina células MCF7

Figura 7. EPO induce un incremento de N-cadherina en células MCF7

Figura 8. Análisis de la expresión genética global del tratamiento con EPO en la línea celular MCF7

Figura 9. Genes desregulados después de la estimulación con EPO al tiempo de 1.5 h

Figura 10. Genes desregulados después de la estimulación con EPO al tiempo de 9 h

Resumen

A nivel mundial el cáncer de mama es la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres mayores de 25 años, su incidencia es heterogénea en todo el mundo mostrando una mayor incidencia en países desarrollados como son los países del norte de América, Europa y Australia. Una complicación frecuente en cáncer de mama es la anemia, que se define como un síndrome clínico caracterizado por la disminución en el nivel de hemoglobina en sangre. Con la finalidad de compensar el estado anémico, a partir de la década de los ochentas, se implementó el usó la eritropoyetina (EPO) como tratamiento, sin embargo, reportes clínicos demuestran que dicho tratamiento promueve progresión tumoral en pacientes con cáncer de mama. Hasta el momento, el mecanismo molecular por el cual EPO desencadena efectos en la progresión tumoral no se ha dilucidado a detalle, por tal motivo resulta importante evaluar su participación en la progresión del cáncer. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el papel de EPO en la respuesta de células de cáncer de mama en procesos tumorales. Nuestros resultados indican que el estímulo con EPO incrementa migración e invasión en células de cáncer de mama metastasicas MDA-MB-231. Por otro lado, la EPO promueve la adquisición de un fenotipo mesenquimal en células de cáncer de mama no metastasicas MCF7, induciendo un proceso de migración celular, así como incrementando la expresión del marcador mesenquimal N-cadherina y regulando negativamente la expresión del marcador epitelial E-cadherina. Por otro lado, la EPO induce una desregulación en la expresión de genes en la línea celular MCF7. En conclusión, nuestros datos sugieren que EPO participa en la progresión tumoral en células de cáncer de mama.

Abstract

Worldwide the breast cancer is the main death cause for tumors in women over 25 years old. The incidence is heterogeneous in the world showing a greater incidence in developed countries such as countries of North America, Europe and Australia. A common complication in breast cancer is anemia, is defined as clinical syndrome characterized by the decrease in the level of hemoglobin in blood. To compensate for the anemic state, since 80´s decade erythropoietin (EPO) was used as a treatment. However, clinical reports show that EPO promotes tumor progression in patients with breast cancer. Until now the molecular mechanism by which EPO triggers effects on tumor progression has not been elucidated in detail, which is why it is important to evaluate its participation in cancer progression. The objective in the present work was to evaluate the role of EPO in the response of breast cancer cells in tumoral progretion, results indicate that the stimulation with EPO increases migration and invasion in metastatic breast cancer cells MDA-MB-231. However, EPO promotes the acquisition of a mesenchymal phenotype in MCF7 non-metastatic breast cancer cells, inducing a cell migration process, as well as increasing the expression of the mesenchymal marker N-cadherin and negatively regulating the expression of epithelial marker E -cadherina. However, EPO induces a deregulation in the expression of genes in the MCF7 cell line. In conclusion, EPO participates in the tumor progression in breast cancer cells.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Glándula mamaria y cáncer de mama

La glándula mamaria es el órgano encargado de la producción y liberación de leche de la madre al recién nacido durante la lactancia. La organogénesis de la glándula mamaria comienza en la embriogénesis, pero continúa hasta la vida adulta, este proceso requiere de señales hormonales para una diferenciación terminal que se adquiere sólo después del embarazo [1-2]. A nivel estructural, la glándula mamaria está constituida por dos compartimentos principales, compartamentalizados por una membrana basal, el epitelio y el estroma. La glándula mamaria se organiza por células glandulares organizadas en lóbulos, y células epiteliales luminales que dan origen a los ductos galactóforos o secretores, dichos ductos se encuentran rodeadas por células mioepiteliales que son contráctiles y participan en la entrega de la leche en la lactancia. El extenso sistema de ductos y alvéolos está inmerso en un abundante estroma, que se compone principalmente de adipocitos, fibroblastos, células del sistema hematopoyético e inmunológico, nervios y vasos sanguíneos los cuales son importantes para el desarrollo y funcionamiento normal mamario [3]. Las células epiteliales y el estroma se comunican entre sí a través de la matriz extracelular (MEC), una desorganización de la comunicación entre el epitelio y el estroma puede inducir y promover el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama.[4]

El cáncer de mama puede iniciar en cualquier parte de la estructura de la glándula mamaria. Sin embargo, se ha reportado que el 80% del cáncer de mama tiene su origen en los ductos mamarios. De manera general el cáncer de mama se caracteriza por una hiperproliferación descontrolada de las células luminales dando como resultado un carcinoma ductal "*in situ*" (DCIS). Durante la progresión tumoral, la capa mioepitelial se desorganiza y se pierde, promoviendo la invasión de células epiteliales luminales hacia el órgano adyacente para formar un carcinoma ductal invasivo (IDC). Subsecuentemente, las células tumorales alcanzan el torrente

sanguíneo y/o linfático para colonizar nuevos órganos, en un proceso denominado metástasis, la cual es la principal causa de muerte por ésta enfermedad [5].

El cáncer de mama tiene un origen heterogéneo, debido a esto, existen diferentes clasificaciones para su diagnóstico. Entre los principales tipos histológicos de carcinoma de mama se encuentran el carcinoma ductal (79%), el lobulillar (10%), el tubular (6%), el mucinoso (2%), el medular (2%), el papilar (1%) y el metaplásico (1%) [6]. Actualmente la expresión de receptores de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor HER2, junto con variables clinicopatológicas, como participación nodal, tamaño del tumor, tipo histológico, grado tumoral, y márgenes tumorales, son usados comúnmente para seleccionar el tratamiento y predecir el pronóstico de la enfermedad. Los fenotipos de cáncer de mama se clasifican en 4 subtipos: luminal A (ER+ y/o PR +, HER2-); luminal B (ER+ y/o PR+, HER2+); basal (ER-, PR-, HER2-) y HER2/neu (ER-, PR, HER2+) [7-9]. Las diferencias moleculares entre los subtipos tumorales son a menudo acompañados de diferencias en las características clínicas de los pacientes con cáncer de mama; encontrándose genes individuales asociados con el pronóstico de la enfermedad [10], por ejemplo:

1. El gen p53. El 50% o más de los tumores humanos contienen mutaciones de este gen. La pérdida homocigótica del gen p53 aparece en casi todos los tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama [11].

2. Los genes BRCA1 y BRCA2. Mujeres con mutaciones en BRCA1 o BRCA2 están en riesgo significativamente mayor de desarrollar cáncer de mama [11-12].

1.2. Etiología del cáncer de mama

La adolescencia y la adultez temprana son particularmente preocupantes a medida que cambia el programa genético, epigenético y procesos fisiológicos en el desarrollo del sistema mamario, lo que conlleva a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama [6,14-16]. Se cree que los cánceres surgen de una serie de mutaciones que ocurren como resultado de la inestabilidad genética y / o factores ambientales [17].

Existen factores de riesgo que predisponen al desarrollo de cáncer de mama y se pueden clasificar como factores internos y externos [18].

Factores internos:

- Menarca temprana
- Menopausia tardía
- Historia familiar
- Mutaciones de los genes *BRCA1* o *BRCA2*.
- Raza y etnia

Factores externos:

- Tabaquismo
- Consumo de alcohol
- Obesidad
- Dieta alta en grasas y carbohidratos
- Poca actividad física o nula
- Uso de terapia de reemplazo hormonal
- Exposición a radiaciones ionizantes
- Nuliparidad
- Primer embarazo a término después de los 30 años de edad.
- Exposición a agentes carcinogénicos

1.3. Anemia y cáncer

La anemia es una complicación frecuente en pacientes con cáncer y afecta la calidad de vida en al menos el 50% de los casos [19]. La anemia es un síndrome clínico caracterizado por una disminución en los niveles de hemoglobina (Hb) en

sangre, considerando la edad, género y altura a nivel del mar a la que vive la persona [20]. La OMS (Organización mundial de la salud) ha definido que los valores en los niveles de hemoglobina inferiores a 12 g/dl son considerados como un cuadro anémico [21] subdividiéndose de la siguiente manera:

Anemia leve: 11.9 - 10.0 g/dl

Anemia moderada: 9.9 – 8.0 g/dl

Anemia severa: ≤ 8.0 g/dl

La anemia en pacientes con cáncer puede ser inducida por el tratamiento con agentes quimioterapéuticos y radiación, pérdida de sangre, déficit nutricional o hemólisis. Sin embargo, es difícil identificar una sola causa debido a su etiología multifactorial [22].

La anemia inducida por tratamiento ocurre como resultado del daño a la médula ósea; la radioterapia y la mayoría de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos causan cierto grado de mielosupresión. La pérdida de sangre después de una cirugía radical contra el cáncer también puede desencadenar anemia [23].

Por otro lado, el tipo más común de anemia no inducida por el tratamiento en pacientes con cáncer se produce principalmente como resultado del tumor y se conoce como anemia crónica [24]. Uno de los tratamientos para compensar la anemia en pacientes con cáncer es la eritropoyetina (EPO). La EPO es una hormona cuya principal función es la de incrementar la concentración de glóbulos rojos en sangre, es altamente efectiva para tratamiento de la anemia, ya que es el factor principal en la regulación de la eritropoyesis [25]. La EPO aumenta significativamente los niveles de Hb y disminuye el requerimiento de transfusión sanguínea. La transfusión aumenta rápidamente los niveles de Hb, pero se asocian con riesgos tales como la transmisión de patógenos infecciosos y la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión [22,26-27].

La regulación en los niveles endógenos de EPO y el mecanismo por el cual el complejo de EPO con su receptor (EPOR) induce la eritropoyesis es desconocida [28]. Actualmente existen en el mercado agentes estimulantes de la eritropoyesis

(ESA): epoetina-α, epoetina-β, y darbepoetin-α, que regulan la eritropoyesis mediante unión y activación de EPOR en la superficie de las células precursoras eritropoyéticas, estimulando supervivencia, proliferación y diferenciación en eritrocitos maduros. Los ESA tiene como objetivo prevenir la anemia en pacientes con cáncer de mama, así como cabeza y cuello sometidos a quimioterapia y radioterapia [29] . La terapia con ESA reduce los requerimientos de transfusión, aumenta la concentración de Hb y mejora la calidad de vida de los pacientes [30]. Sin embargo, existen reportes que señalan que la terapia con ESA disminuye la supervivencia en algunos grupos de pacientes con cáncer [31]. Además, un estudio reciente de meta-análisis de 42 ensayos con 8167 pacientes sugirió que el tratamiento de la anemia con un ESA afecta la supervivencia global en pacientes con cáncer [32]. Asimismo otro estudio demostró un peor pronóstico en aquellos pacientes con cáncer de mama sometidos a quimioterapia tratados con ESA en comparación con un grupo tratado con placebo [33].

1.4. EPO y EPOR

La EPO es la principal citocina relacionada con el control de la eritropoyesis, esta hormona es producida principalmente en riñón pero otros órganos como hígado y cerebro también la producen [34]. El gen de la EPO humana está localizado en el cromosoma 7 (7q 21-22), presenta cinco exones y cuatro intrones y el ARN mensajero codifica un polipéptido de 193 residuos de aminoácidos. EPO es una glicoproteína de 34 kDa y posee un alto contenido en carbohidratos (39%) distribuidos en cuatro grupos: tres N-glicosilaciones en los residuos de asparagina en las posiciones 24, 38 y 83 así como una O-glicosilación en el residuo de serina en la posición 126 que son esenciales para garantizar una circulación prolongada en el plasma. La EPO presenta dos enlaces disulfuro, uno que se forma entre las cisteínas localizadas en las posiciones 7 y 161 y el otro entre las cisteínas de las posiciones 29 y 33 [35-36]. La expresión génica de EPO está regulada por niveles de oxígeno en sangre a través de la hipoxia. Los factores de transcripción implicados en la regulación de la transcripción del gen de EPO son HIF-1α, HIF-1β, y HIF-3α, HIF-2, HNF-4 alfa, GATA-2 y NF-kB. La EPO se secreta del riñón hacia al

torrente sanguíneo, circula hasta la médula ósea donde es captada con la finalidad de regular la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides [37-39].

Por otro lado, el gen EPOR humano abarca más de 6 Kb y contiene 8 exones que codifican una proteína de 508 aminoácidos. El gen está localizado en el cromosoma 19 en la posición 19(p13.3-13.2) [37]. EPOR es expresado como una proteína de 66 a 78 kDa conformada por tres dominios: uno extracelular, uno transmembranal y uno intracelular [35]. Este receptor es codificado por un solo gen dando origen a tres isoformas diferentes: proteína transmembranal funcional (EPOR-F), proteína truncada (EPOR-T) y proteína soluble (EPOR-S) [37].

Además de las células eritropoyéticas, EPOR se expresa en muchos tejidos no hematopoyéticos, así como en células de cáncer [34,37,41]. La EPO es un factor pleiotrópico que regula el crecimiento y supervivencia en otros tejidos incluyendo el cerebro, tejidos cardiovasculares (endotelio, músculo y cardiomiocitos), hígado, tejidos gastrointestinales, páncreas, riñón, testículos y órganos reproductores femeninos. Además tiene un efecto neurotrófico y neuroprotector [42-43].

La unión de EPO a su receptor induce la homodimerización de EPOR, promoviendo la activación de JAK2, el cual fosforila residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de EPOR, creando sitios de acoplamiento para moléculas de señalización con dominios SH2, desencadenando rutas de señalización rio abajo, tales como las vías de STAT5, PI3K/Akt, MAPK y PKC, promoviendo procesos de proliferación y diferenciación de células progenitoras eritroides [40].

1.5. Migración celular y FAK

La migración celular es fundamental para el desarrollo metastásico de las células cancerosas [44], durante este proceso la célula debe alterar así como modificar proteínas de señalización que conducen a interacciones con la MEC, esta matriz proporciona proporciona el sustrato, así como una barrera de avance de la célula [45-47].

La migración celular es un proceso coordinado que involucra cambios rápidos en la dinámica de los filamentos de actina, conjuntamente con la formación y el desensamble de adhesiones focales [48]. Las adhesiones focales son sitios donde las células están en contacto con la MEC, siendo enriquecidas en integrinas y en proteínas citoesqueléticas y de señalizació, que incluyen talina, α-actinina, vinculina, paxilina y cinasa de adhesión focal (FAK) [49-50]. La cinasa FAK se ha asociado al control de la motilidad celular e invasión [51] a través de la regulación de invadopodios, responsables de la capacidad de las células cancerosas para degradar e invadir a través de la MEC [52]. Diversas vías de señalización rio debajo de FAK han sido implicadas en la mediación de la promoción de la migración celular. Una vía particularmente bien caracterizada es a través del reclutamiento y fosforilación de la proteína p130Cas hacia el complejo FAK / Src [53]. Además este complejo puede conducir a la activación de cascadas de señalización de las vías Ras-ERK2 y Rac-JNK [48].

1.6. Invasión celular

La invasión tumoral se caracteriza por la penetración de células cancerosas a través de la MEC en el tejido circundante, tal proceso requiere alteraciones en la dinámica de las adhesiones focales, junto con la degradación proteolítica de la matriz [44]. La capacidad de invasión requiere múltiples pasos. Las células tumorales con frecuencia invaden el tejido circundante cuando el tumor comienza a crecer. Un incremento en el tamaño del tumor genera condiciones de hipoxia promoviendo una demanda de oxígeno y nutrientes. Esto conlleva al reclutamiento de células endoteliales hacia el interior del tumor para generar nuevos vasos sanguíneos, facilitando que las células del tumor se intravasen y viajen a través de la circulación sanguínea. Finalmente, las células tumorales deben detenerse en los órganos distantes, extravasarse y migrar al nuevo sitio metastásico y comenzar el ciclo de invasión nuevamente [54].

1.7. Metaloproteinasas de matriz

Las metaloproteinasas (MMPs) son endopeptidasas dependientes de Ca^{2+} / Zn^{+2}, pertenecen a una familia de enzimas que tienen como función principal la degradación de la MEC [55]. Estas endopeptidasas son capaces de regular funciones celulares múltiples incluyendo crecimiento celular, apoptosis, angiogénesis, invasión, metástasis y respuesta inmune por escisión de factores de crecimiento precursores, moléculas de adhesión celular y otras proteínas bioactivas [54]. Las MMPs pueden regular el microambiente tumoral, su expresión y activación aumentan en casi todos los cánceres de seres humanos en comparación con el tejido normal y se correlaciona con el estadio tumoral avanzado, mayor invasión, metástasis y una supervivencia más corta [56].

La estructura básica de las MMPs es que presentan una serie de dominios: un péptido señal, un propéptido y un dominio catalítico carboxilo-terminal que une al átomo de Zn^{+2}. Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes: un dominio tipo hemopexina que media la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos o un dominio transmembranal en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática [57]. Las MMPs son sintetizadas como zimógenos inactivos, que se mantienen inactivas por una interacción cisteína-sulfidrilo en el dominio del propéptido y el Zn^{+2} unido al dominio catalítico: la activación requiere la eliminación proteolítica del prodominio del propeptido. La concentración de MMPs, especialmente de MMP-2, se considera un indicador de metástasis de cáncer de mama. La actividad de las MMPs está regulada por proteínas TIMP (Inhibidores tisulares de metaloproteinasas) -1, -2, -3 y -4, que inhiben reversiblemente a las MMPs en forma estequiométrica 1: 1 [58].

1.8. Transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (TEM) consiste en la transdiferenciación de las células epiteliales para adquirir características morfológicas mesenquimales, un proceso caracterizado por la pérdida de la polaridad apico-basal, reorganización del citoesqueleto de actina, así como un cambio en los programas de señalización intracelular y reprogramación génica que definen un fenotipo migratorio e invasivo [59]. La TEM es un proceso celular que se presenta de manera fisiológica en el

desarrollo del embrión, de forma coordinada y organizada, además involucrado en procesos como en la cicatrización de heridas, regeneración de tejidos y fibrosis de órganos. Sin embargo, la TEM está involucrado en la progresión tumoral donde las células cancerosas se separan de las células periféricas y forman metástasis a través de la infiltración a la sangre o sistema de circulación linfática [60-63].

Existen marcadores moleculares que son comúnmente usados para caracterizar la TEM. Estos incluyen mayor expresión de N-cadherina, vimentina y fibronectina, una localización nuclear de β-catenina, asi como un aumento en la expresión de factores de transcripción como Snail1 (Snail), Snail2 (Slug), Twist, EF1 / ZEB1, SIP1 / ZEB2 y / o E47 y NF-κβ. El incremento en la expresión de estos factores de transcripción favorecen una represión génica de marcadores epiteliales como E-cadherina, desmoplaquina, citoqueratinas y ocludinas [59,64-65].

1.9. Cadherinas

El epitelio normal presenta contactos célula-célula estrechamente regulados y localizados para un adecuado desarrollo y función de las estructuras epiteliales. Estos contactos celulares limitan la capacidad de las células epiteliales para moverse o migrar. Se ha propuesto que las células tumorales epiteliales pierden esta restricción durante los últimos pasos del proceso de tumorigénesis [66]. Una característica de las células epiteliales y mesenquimales es la expresión diferencial de proteínas como cadherinas, que son una familia de proteínas de adhesion que se divide en subclases que muestran diferentes patrones de distribución en tejidos, siendo las mejor descritas E-cadherina, N-cadherina y P-cadherina. Estas proteínas transmembranales se caracterizan por contener un dominio extracelular con cinco dominios de unión a Ca^{2+} [67]. Una proteína prominentemente asociada con la invasión tumoral, la diseminación metastásica y un pobre pronóstico del paciente es la molécula de adhesión de células epiteliales E-cadherina. Existen reportes que indican que la pérdida de E-cadherina promueve la metástasis [68], ya que la expresión de E-cadherina se regula negativamente o se pierde en los tumores epiteliales de varios tejidos, incluidos estómago, colon, cabeza y cuello, vejiga, próstata y mama [69]. Por otro lado se ha reportado que durante el desarrollo

tumoral hay una ganancia de expresión de otra molécula de adhesión, N-cadherina, que se asocia con un mayor potencial invasivo. N-cadherina está regulada positivamente en líneas células de cáncer de mama invasivas y menos diferenciadas que carecen de la expresión de E-cadherina [70].

II. JUSTIFICACIÓN

La anemia es un padecimiento implicado en cáncer de mama y con el propósito de contrarrestar el estado anémico, se ha utilizado la EPO como tratamiento. Sin embargo, reportes clínicos demuestran que la EPO promueve la progresión tumoral en pacientes con cáncer de mama. Hasta el momento, el mecanismo molecular por el cual EPO desencadena estos efectos no se ha dilucidado a detalle, por tal motivo resulta importante evaluar su participación en la progresión tumoral.

III. HIPÓTESIS

La EPO inducirá la capacidad de migración y/o invasión en las líneas celulares de cáncer de mama.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la EPO en procesos de migración e invasión en células de cáncer de mama invasivas y no invasivas.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto de la EPO en procesos de migración y/o invasión en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7.
- Evaluar la activación de proteínas implicadas en procesos de migración celular como FAK y Src.
- Evaluar marcadores de transición epitelio-mesénquima en células MCF7.
- Evaluar el efecto de EPO sobre la expresión diferencial de genes.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

La eritropoyetina humana recombinante (EPO) fue obtenida de Probiomedic (México). El anticuerpo anti-E-cadherina 67A4, anti-N-cadherina 13A9, anti-Cinasa de adhesion focal (FAK) C-20, anticuerpos fosfoespecíficos anti-Y397 de FAK (anti-p-FAK) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz,CA). Anticuerpo anti-actina fue proporcionado por el Dr. Manuel Hernandez (Cinvestav-IPN).

Cultivo Celular

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer mamario MDA-MB-231 (invasivas) y MCF7 (no invasivas). Estas células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, 3.7 g/l de bicarbonato de sodio y una mezcla de antibióticos en una atmósfera al 5% de CO_2 y 95% de aire a 37°C.

Estimulación celular con EPO y obtención de proteínas totales

Una vez que las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 alcanzaron un 95% de confluencia, fueron ayunadas por 24 h para la línea celular MDA-MB-231 y 18 h para la línea celular MCF7. Posterior a este tiempo, las células fueron lavadas con solución PBS (K_2HPO_4 10 mM, NaCl 150 mM, con pH 7.2-7.4). Fueron estimuladas con 5 UI/mL de EPO a diferentes tiempos. Con la finalidad de obtener los extractos totales de proteínas, una vez concluido el tiempo de estímulo, las células fueron lisadas con 400 µL de solución RIPA (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, NaF 100 mM, $Na_4P_2O_7$ 10 mM, glicerol 10 %, Tritón X-100 1 %, desoxicolato de sodio 1 %, $MgCl_2$ 1.5 mM, SDS 0.1 % y PMSF 1 mM) a 4° C. Los lisados fueron centrifugados a 12,000 rpm por 10 minutos a 4° C y el sobrenadante fue colectado. La cuantificación de proteínas fue realizada mediante el método de micro-Bradford.

Inmunodetección (Western blot)

Proteínas totales de cada muestra (40 µg) fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE 10% y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

Posteriormente, la membrana fue bloqueada con leche semidescremada al 5% en PBS/Tween 20 al 0.1% a temperatura ambiente durante 1 h. Adicional a esto, la membrana fue incubada toda la noche a 4° C con el anticuerpo correspondiente. Una vez terminada la incubación la membrana fue lavada tres veces por 5 minutos con PBS/Tween 20 al 0.1% e incubada con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) por 2 h. Finalmente, las bandas de interés se detectaron por autorradiografía usando un reactivo quimioluminicente. Las bandas fueron analizadas por densitometría usando el programa ImageJ (NIH, USA) y el promedio de la intensidad media de fluorescencia se graficó con el programa GraphPad Prism versión 6.0.

Ensayo de migración mediante cierre de herida (scratch)

El efecto de EPO sobre la migración en las células MDA-MB-231 y MCF7 fue evaluado mediante un ensayo de cierre de herida. Brevemente, células fueron cultivadas en cajas de 35mm, hasta un 95% de confluencia, las células MDA-MB-231 fueron ayunadas por 24 h y células MCF7 por 18 h. Posteriormente, las células fueron incubadas con mitomicina C a una concentración de 12 µM por 2 h previo al estímulo. Después se realizó una rayadura sobre la monocapa con la punta de una pipeta estéril de 200 µL, las células se lavaron 3 veces con PBS. Diferentes concentraciones de EPO (1, 3, 5, 7, 10 UI/mL) se añadieron a las cajas, 48 h después del estímulo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 minutos y teñidas con cristal violeta al 0.1% por 20 minutos. Al término de la tinción la migración celular fue analizada mediante el programa ImageJ (NIH, USA) y el promedio de la intensidad media de fluorescencia se graficó con el programa GraphPad Prism versión 6.0.

Ensayo de invasión (Cámaras de Boyden)

El ensayo de invasión se llevó a cabo en cámara de Boyden *BD*® la cual contiene insertos con poros de 8 µm de diámetro. Células MDA-MB-231 fueron crecidas a confluencia y ayunadas por 24 h, se sembraron aproximadamente 100,000 células en la parte superior de cada inserto, previamente recubiertos con matrigel a una concentración de 3 mg/mL en un volumen de 50 µL. En la parte inferior del pozo en

la cámara de Boyden, se colocó el estímulo con concentraciones crecientes de EPO. Células fueron incubadas por 48 h a 37° C en una atmósfera de 5% de CO2. Con la finalidad de remover células en la parte superior del inserto que no fueron capaces de invadir, se retiró el matrigel con un hisopo de algodón y posteriormente las células que lograron invadir fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 minutos y teñidas con cristal violeta 0.1%, seguido de tres lavados con PBS. Las membranas fueron colocadas en 200 µL de ácido acético 10% y cada muestra fue analizada por absorbancia a 600 nm. Los resultados de las absorbancias fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0. y representa la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Zimografía en gelatina

Células MDA-MB-231 fueron ayunadas por 24 h, posterior a este tiempo, células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de EPO por 48 h. El medio condicionado fue recolectado y concentrado por centrifugación en tubos Amicon (Merck Millipore) por 2 h a 2500 rpm a 4°C. Los geles se prepararon a una concentración de 8% de poliacrilamida con 1 mg/mL de gelatina. Después de la electroforesis, los geles fueron lavados 3 veces con tritón 2.5% durante 30 minutos y se incubaron en solución de incubación (Tris 0.050 M, CaCl2 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) durante 24-48 h a 37° C. Los geles fueron teñidos con solución de Azul brillante de Coomassie R250 (50% de metanol y 10% de ácido acético) en agitación suave, los geles fueren desteñidos con una solución decolorante (50% de metanol absoluto, 10% de ácido acético y 40% de H2O bidestilada). Los geles fueron escaneados y analizados cualitativamente.

Expresión génica por microarreglos

Células MCF7 fueron ayunadas por 18 h y estimuladas con 5 UI/mL de EPO por 1.5 y 9 h. El ARN total de cada condición fue aislado mediante el kit comercial *RNeasy* (*QIAGEN*), según las instrucciones del fabricante. La calidad e integridad del ARN fue analizado en la Unidad de Alta Tecnología (UAT) del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Una vez realizada la validación, las muestras fueron analizadas por microarreglos utilizando el Genechip Human Transcriptome

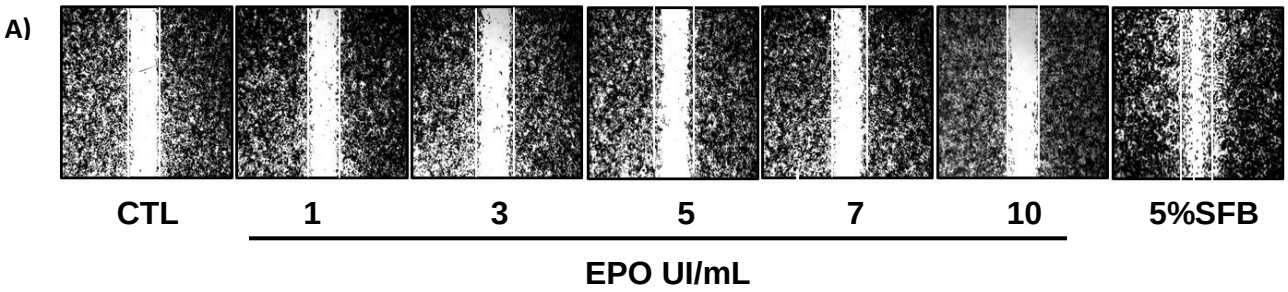
Array 2.0. Para obtener los resultados de los genes diferencialmente expresados de los microarreglos, se utilizó el programa TAC (Transcriptome analysis console) de Affymetrix.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 6. Cada experimento fue repetido al menos tres veces. Se aplicó ANOVA de una vía para realizar comparaciones de grupos múltiples. Un valor de probabilidad (p) <0.05 se consideró estadísticamente significativo.

VIII. RESULTADOS

Reportes clínicos indican una fuerte asociación entre EPO y la progresión tumoral [31]. Uno de los procesos clave en esta progresión, es la migración celular. Debido a esto, se analizó si el estímulo con EPO es capaz de promover migración en la línea celular MDA-MB-231 mediante el ensayo de cierre de herida. Las células MDA-MB-231 fueron ayunadas por 24 horas, posterior al tiempo de ayuno, fueron estimuladas con EPO a diferentes concentraciones (1, 3, 5, 7 y 10 UI/mL) por 48 horas. Los resultados muestran que EPO induce migración celular en las concentraciones de 3, 5 y 7 UI/ml (Fig.1)



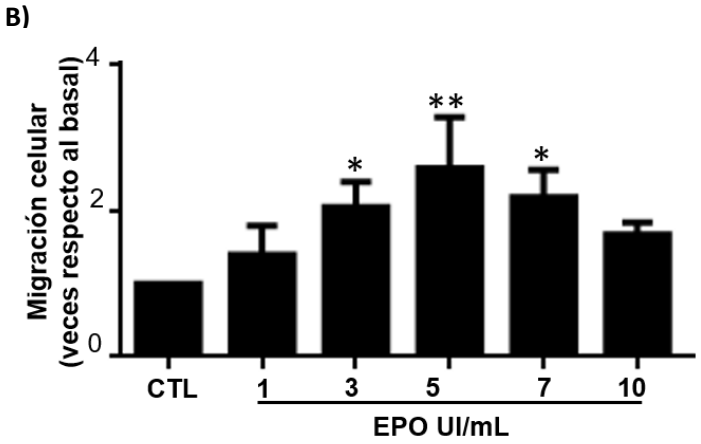


Figura 1. EPO promueve migración en la línea celular MDA-MB-231. A) Imágenes representativas del ensayo de cierre de herida. B) Análisis cuantitativo de la migración celular a diferentes concentraciones de EPO (1, 3, 5, 7, 10 UI/ml). El ensayo de cierre de herida se determinó mediante el programa ImageJ (NIH, USA). Los datos son representativos de tres experimentos independientes y el análisis fue realizado en el programa GraphPad Prism versión 6.0. *$p<0.05$, **$p<0.01$.

El proceso de migración celular es regulado por la activación espacio-temporal de proteínas específicas. Una proteína bien estudiada en este proceso es FAK, por ello fue evaluado el efecto de la EPO sobre la fosforilación de FAK (Y397) que indica la activación de FAK en la línea celular MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 fueron ayunadas por 24 h, debido a que se encontró un mayor efecto sobre la migración con una concentración de 5 UI/mL, las células fueron estimuladas con 5 UI/mL de EPO a diferentes tiempos. Al término del estímulo las células fueron lisadas con la finalidad de obtener los extractos totales y éstos fueron analizados mediante el ensayo de western blot. Utilizando un anticuerpo específico anti P-FAK (Y397) fueron observados dos puntos de fosforilación a los 5 y 15 minutos posterior al estímulo (Fig.2).

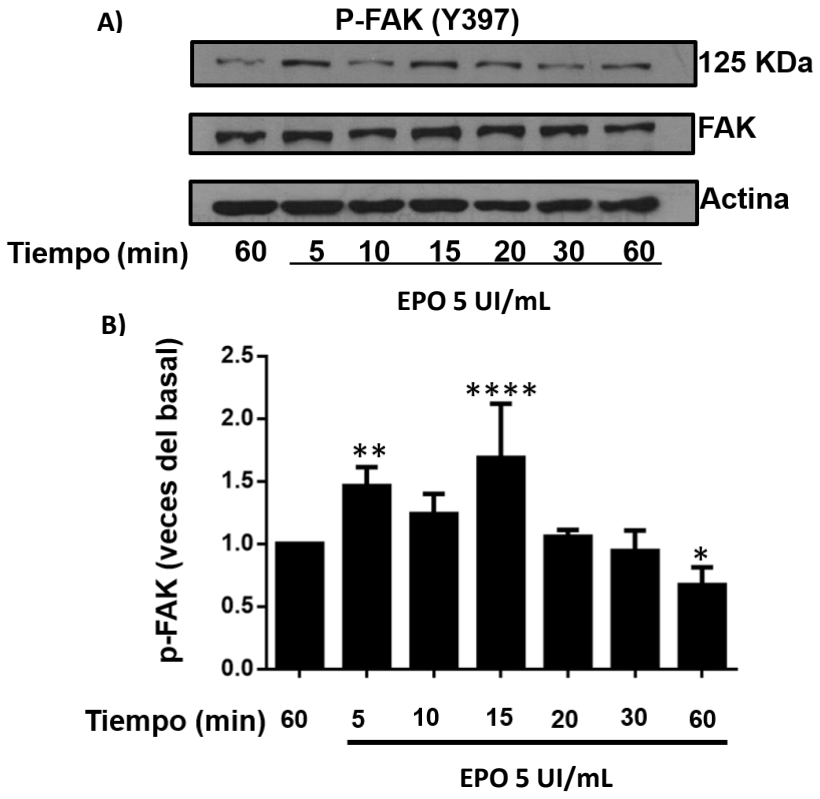


Figura 2. EPO induce la activación de FAK en la línea celular MDA-MB-231. A) Imagen representativa del ensayo de western blot usando lisados totales de células MDA-MB-231 estimuladas con EPO (5 UI/mL) a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 30, 60 min.). Se utilizó un anticuerpo anti P-FAK (Y397) y como controles de carga se usaron los anticuerpos anti-FAK, y anti-actina. B) Análisis cuantitativo de los niveles de proteína de P-FAK (Y397) tras la estimulación con 5 UI/mL de EPO a diferente tiempo. La gráfica muestra el análisis estadístico de tres experimentos, el cual se realizó con el programa ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. *p<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001.

Para investigar si EPO tiene un efecto en la invasión celular, se realizaron ensayos de invasión celular en cámara de Boyden modificada con matrigel. Las células MDA-MB-231 fueron ayunadas por 24 h. Posterior al ayuno, las células fueron colectadas y se colocaron 100,000 células en cada condición en la parte superior del inserto de la cámara de Boyden y en la parte inferior fue colocado el estímulo de EPO a concentraciones de 5 y 7 UI/mL ya que estas concentraciones se han reportado que inducen una mayor invasión celular [96]. Los resultados obtenidos indican que EPO induce invasión estadísticamente significativa a la concentración de 7 UI/mL con respecto al control (Fig.3). Los resultados anteriores demuestran que EPO induce invasión en células MDA-MB-231.

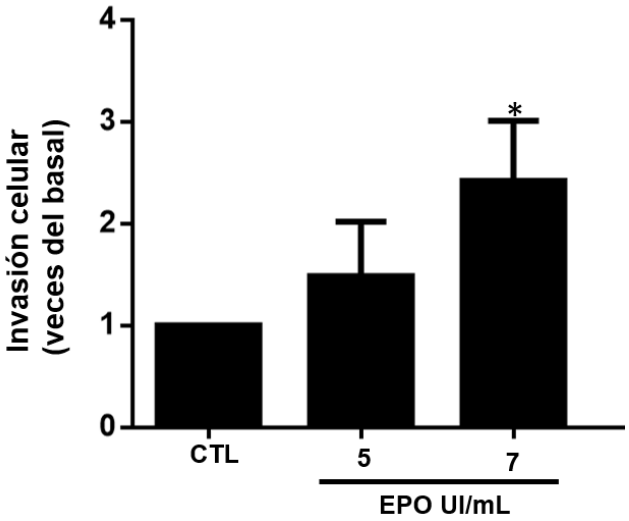


Figura 3. EPO promueve invasión en la línea celular MDA-MB-231. Los ensayos de invasión fueron realizados en cámara de Boyden modificada con matrigel. La gráfica muestra el análisis estadístico de tres experimentos independientes y los resultados fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism versión 6.0. *$p<0.05$.

Se ha descrito que la secreción de MMPs desempeña un papel importante en la progresión tumoral en especial las MMPs 2 y 9 [58], por tal motivo decidimos evaluar el papel de la EPO en la secreción de gelatinasas (MMPs 2 y 9). Células MDA-MB-231 fueron ayunadas por 24 horas y estimuladas con diferentes concentraciones de EPO (1, 3, 5, 7, 10 UI/mL) por 48 h. El medio condicionado fue colectado y posteriormente se realizaron ensayos de zimografía (Fig.4). Los resultados indican, una mayor secreción de MMPs 2 y 9 de manera independiente de la concentración de EPO en comparación con el control a excepción de la concentración de 10 UI/mL.

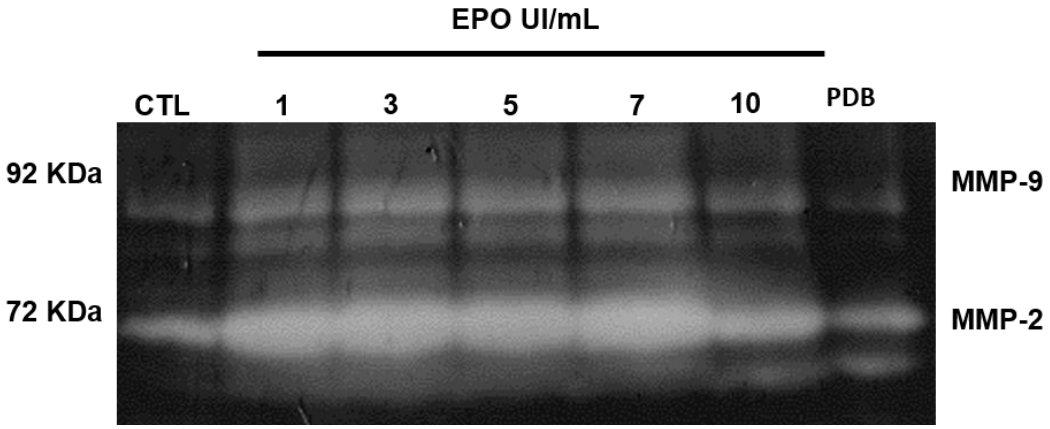


Figura 4. EPO induce secreción de gelatinasas en células MDA-MB-231. Zimograma representativo de tres experimentos independientes utilizando concentraciones crecientes de EPO (1, 3, 5, 7 y 10 UI/mL) a un tiempo de 48 horas. Células MCF7 tratadas con PDB fueron utilizadas como control positivo de la secreción de MMPs 2 y 9. Las bandas blancas representan la actividad gelatinolítica de las MMPs y es representativo de tres experimentos independientes.

Por ensayo de cierre de herida fue evaluado si el estímulo con EPO es capaz de promover migración celular en la línea celular MCF7 o si específica para la línea celular MDA-MB-23. Las células MCF7 fueron ayunadas por 18 horas. Posterior al tiempo de ayuno, las células fueron estimuladas con EPO a diferentes concentraciones (1, 3, 5, 7 y 10 UI/mL). Los resultados muestran que EPO induce migración celular en las concentraciones de 3, 5 y 7 UI/mL (Fig.5)

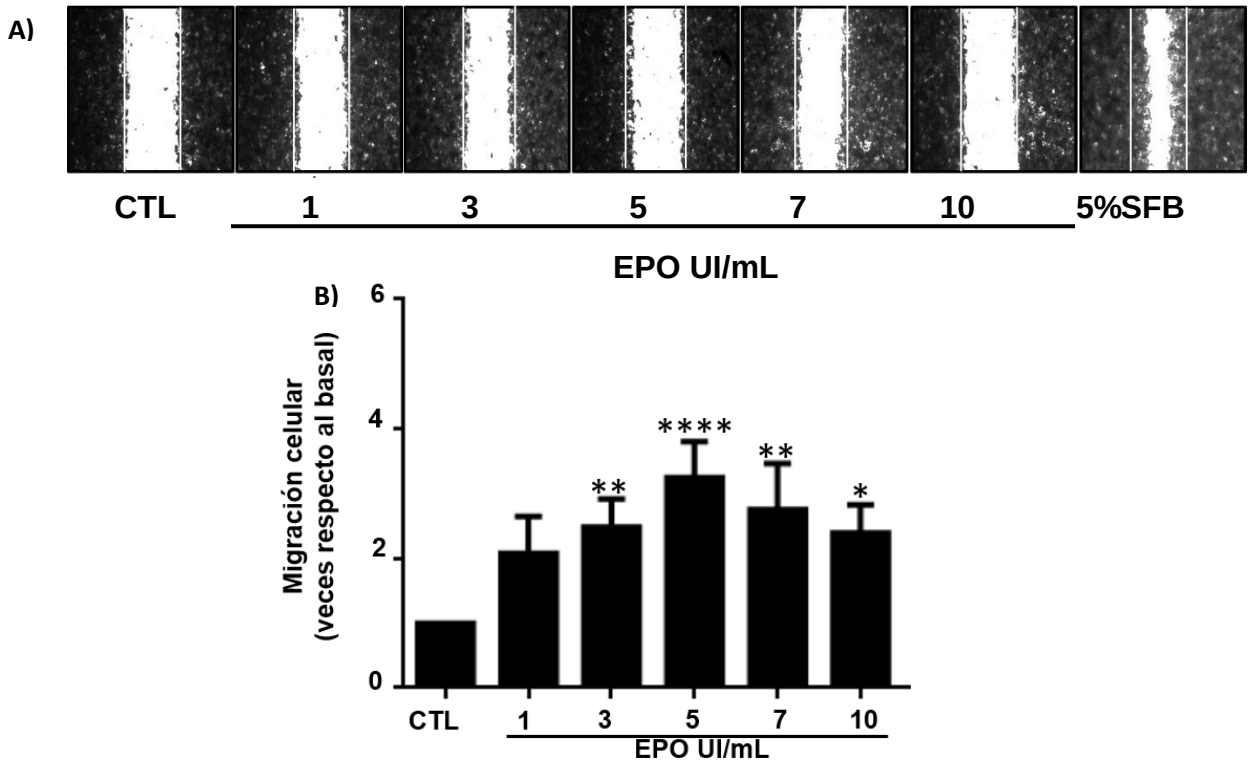


Figura 5. EPO promueve migración en la línea celular MCF7. A) Imágenes representativas del ensayo de cierre de herida. B) Análisis cuantitativo de la migración celular a diferentes concentraciones de EPO (1, 3, 5 7, 10 UI/mL). El ensayo de cierre de herida se determinó mediante el programa ImageJ ImageJ (NIH, USA). Los datos son representativos de tres experimentos independientes los cuales fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism versión 6.0. *p<0.05, **p<0.01, ****P<0.0001.

Dado que la línea celular MCF7 aún conserva algunas características epiteliales, se evaluó el efecto de EPO sobre proteínas involucradas en adhesión celular tales como la E-cadherina y N-cadherina ya que se ha demostrado que EPO regula negativamente la expresión de E-cadherina y positivamente la expresión de N-

cadherina [96]. Células MCF7 fueron ayunadas por 18 h. Posterior al ayuno, las células fueron estimuladas con 5 UI/mL de EPO a diferentes tiempos (0.25, 0.5, 1, 3, 6 y 9 h), al término del estímulo las células fueron lisadas con la finalidad de obtener los extractos totales y éstos fueron analizados mediante el ensayo de western blot. Utilizando un anticuerpo específico anti-E-cadherina observamos un decremento en su expresión a los tiempos de 0.25, 6 y 9 h (Fig. 6). Por otro lado se evaluó N-cadherina. Utilizando un Ab específico anti-N-caherina se observó un incremento en su expresión a las 6 h después del estímulo con EPO (Fig. 7).

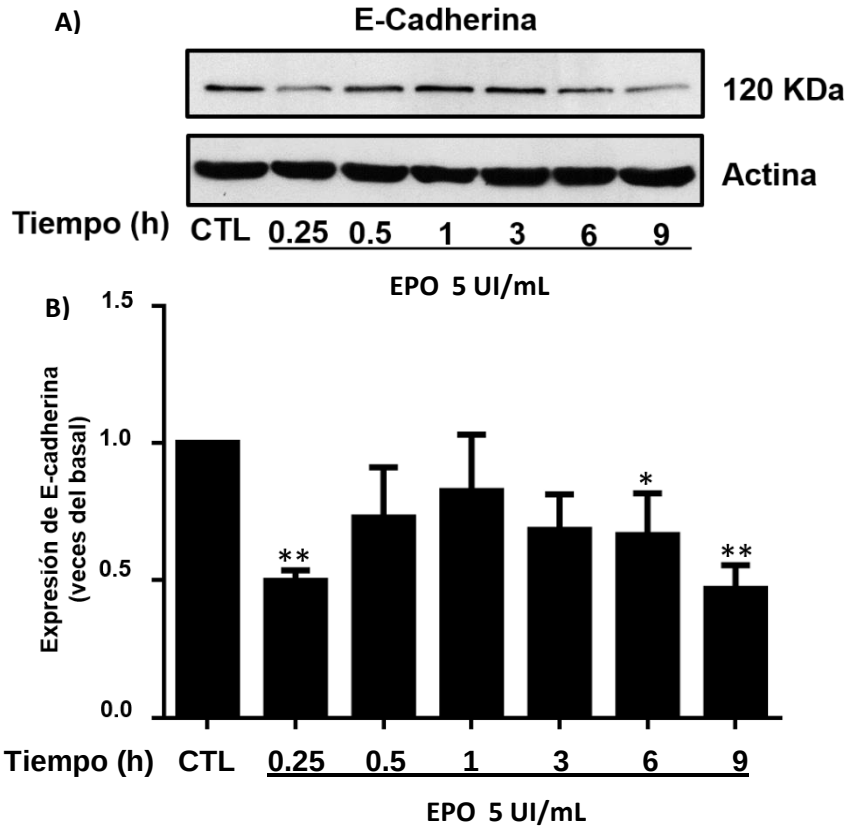


Figura 6. EPO induce un decremento en la expresión de E-cadherina. A) Imagen representativa del ensayo de western blot usando lisados totales de células MCF7 estimuladas con EPO (5 UI/mL) a diferentes tiempos (0,25, 0.5, 1, 3, 6, 9 h). Se utilizó un anticuerpo anti-E-cadherina y como control de carga se usó un Ab anti-actina. B) Análisis cuantitativo de los niveles de proteína de E-cadherina tras la estimulación con 5 UI/mL de EPO a diferentes tiempos. La gráfica muestra el análisis estadístico de tres experimentos, el cual se realizó con el programa ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. *p<0.05, **P<0.01.

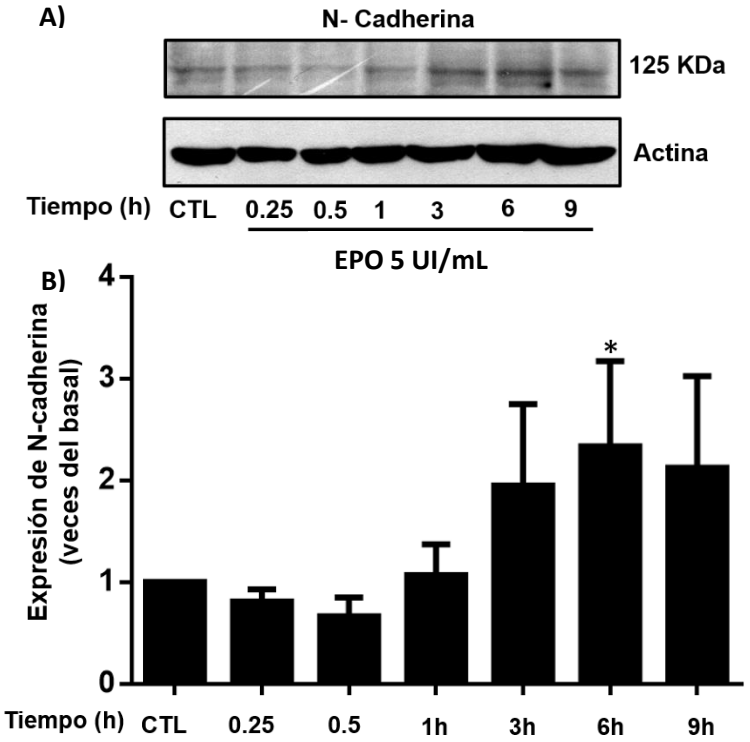


Figura 7. EPO induce un incremento en la expresión de N-cadherina. A) Imagen representativa del ensayo de western blot usando lisados totales de células MCF7 estimuladas con EPO (5 UI/mL) a diferentes tiempos (0,25, 0.5, 1, 3, 6, 9 h). Se utilizó un Ab anti-N-cadherina y como control de carga se usó un Ab anti-actina. B) Análisis cuantitativo de los niveles de proteína de N-cadherina tras la estimulación con 5 UI/mL de EPO a diferentes tiempos. La gráfica muestra el análisis estadístico de tres experimentos, el cual se realizó con el programa ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. *$p<0.05$.

Debido a que se encontró que EPO induce una desregulación en proteínas como E-cadherina (marcador de fenotipo epitelial) y N-cadherina (marcador de fenotipo mesenquimal), se evaluó si la EPO es capaz de inducir una expresión diferencial de genes por medio de microareglos en la línea celular MCF7. Las células MCF7 fueron ayunadas por 18 h, posterior al ayuno se realizó el estímulo con EPO a una concentración de 5 UI/mL a las 1.5 y 9 h. El ARN total se extrajo mediante el kit *RNeasy* (*QIAGEN*). La UAT del INMEGEN se encargó de evaluar la calidad e integridad del ARN obtenido. Posterior a la evaluación del ARN, se realizaron los ensayos de microarreglos utilizando los microarreglos GeneChip™ Human Transcriptome Array 2.0. Los cuales analizan 245,349 transcritos codificantes y

40,914 no codificantes. El análisis fue realizado utilizando el programa TAC (Transcriptome Analysis Console) de Affymetrix en el cual se realizó una representación de genes según su expresión diferencial y significatividad estadística en una gráfica de volcán tomando en cuenta los genes que tuvieron dos o más veces de cambio (fold change) con respecto al control con una significancia estadística de $p<0.05$. Los resultados obtenidos del estímulo con EPO a un tiempo de 1.5 h muestran un total de 32 ID desregulados, de los cuales 11 se encontraban sobreexpresados (8 corresponden a genes reportados) y 21 subexpresados (6 corresponden a genes reportados) (Fig.8A y B). Por otro lado los resultados del estímulo con EPO a un tiempo de 9 h demostró un total de 26 ID desregulados, 14 se observaron sobrexpresados (7 corresponden a genes reportados), mientras que 12 se observaron subexpresados (2 corresponden a genes reportados). Se realizaron los mapas de calor correspondientes a cada condición (1.5 y 9 h), mostrando en color rojo los genes sobreexpresados y en color verde los genes subexpresados (Fig. 8C y D). Finalmente se realizó un listado tanto de genes sobreexpresados y subexpresados a los tiempos de 1.5 (Fig. 9) y 9 h (Fig.10). Por medio del ID se realizó una búsqueda en la base de datos de NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) y se encontraron algunos genes desregulados involucrados con el proceso de transición epitelio-mesénquima, proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

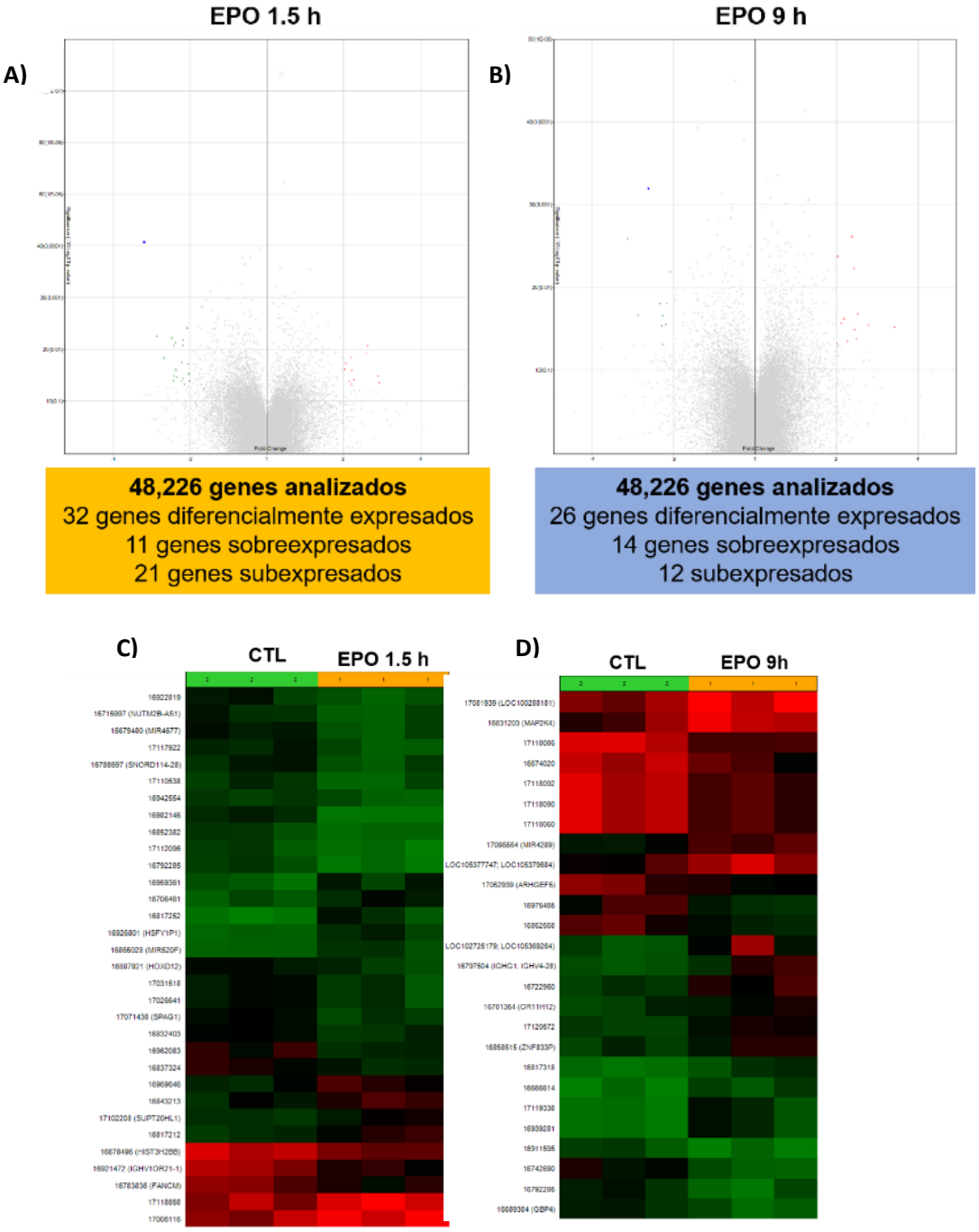


Figura 8. Análisis de la expresión genética global del tratamiento con EPO en la línea celular MCF7. Gráfica de volcan que representa la expresión diferencial de los genes de acuerdo a su significancia estadística a los tiempos de A) 1.5 h y B) 9 h. El mapa de calor representa los cambios en la expresión genética después del tratamiento con EPO a C) 1.5 h y D) 9 h, el color verde representa una expresión genética reducida mientras que el color rojo una expresión incrementada. Las imágenes muestran tres experimentos independientes con una significancia de $p<0.05$.

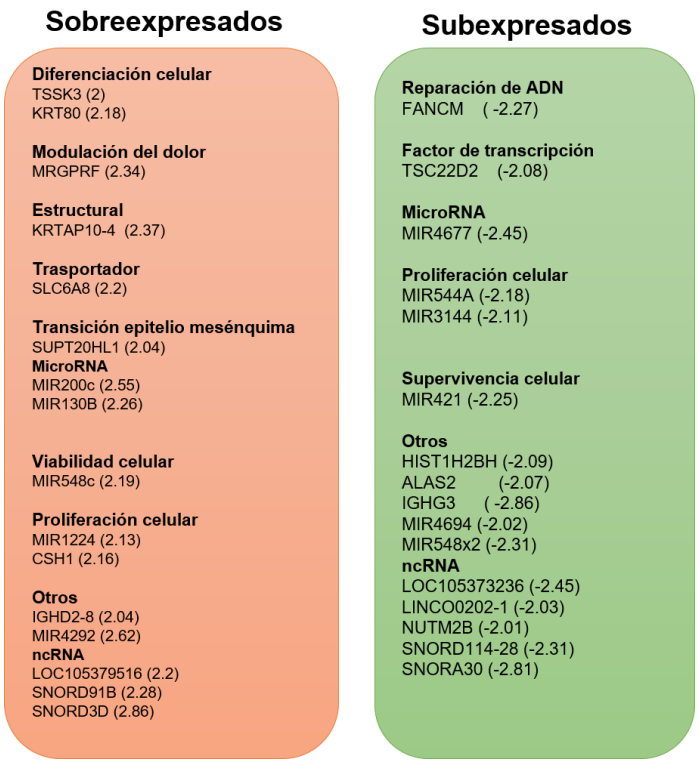


Figura 9. Genes desregulados después de la estimulación con EPO al tiempo de 1.5 h. Listado de genes sobreexpresados en color rojo y en color verde los genes subexpresados respecto a una intensidad de referencia.

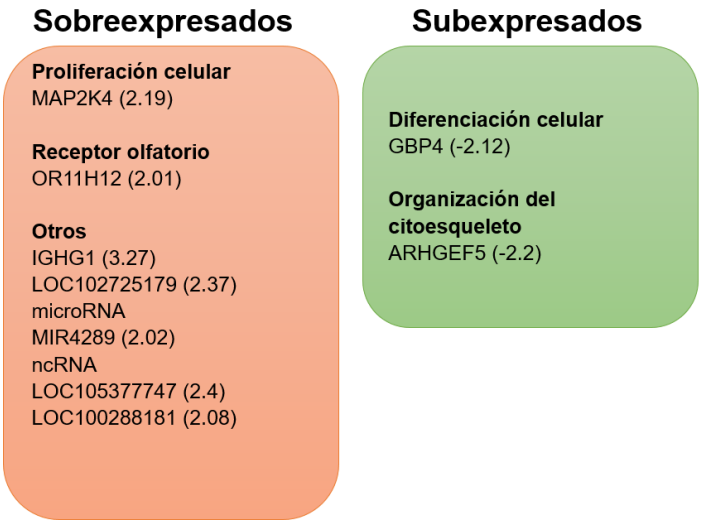


Figura 10. Genes desregulados después de la estimulación con EPO al tiempo de 9 h. Listado de genes sobreexpresados en color rojo y en color verde los genes subexpresados respecto a una intensidad de referencia.

IX. DISCUSIÓN

La anemia es un trastorno frecuente en pacientes con cáncer, se asocia de forma independiente con tiempos de supervivencia más cortos [26]. La incidencia de anemia aumenta con la progresión de la enfermedad y la edad de los pacientes [71], se asocia con fatiga, dificultad respiratoria, dolor de cabeza, mareos, depresión, pérdida de apetito y trastornos del sueño, por lo tanto, afecta la calidad de vida [72-73]. La anemia en pacientes con cáncer tiene origen multifactorial, puede ser inducida por el tratamiento con agentes quimioterapéuticos y radiación, pérdida de sangre, déficit nutricional o hemólisis [22,74]. Por lo tanto, el tratamiento óptimo de la anemia parece ser un componente crítico del tratamiento del cáncer [26]. La EPO aumenta significativamente los niveles de Hb, disminuye los requerimientos de transfusión y mejora significativamente la calidad de vida de los pacientes [33]. Por otro lado, estudios recientes sugieren que EPO puede aumentar el riesgo de progresión tumoral y disminuir la supervivencia en pacientes con cáncer de mama [75] ya que activa diferentes vías de señalización, dando como resultado la proliferación y supervivencia de la célula cancerosa [76]. Se ha demostrado que EPO promueve la progresión tumoral en modelos murinos inyectados con células cancerosas mamarias y activa la vía de señalización de JAK2/STAT5 [77-78]. Además se ha reportado que activa otras vías de supervivencia celular como PI3K/AKT, Ras/ERK1/2, bcl-xl [79-81]. La expresión de EPO / EPOR está regulada por estrógeno y / o progesterona [82], resulta interesante evaluar el comportamiento de una línea celular de cáncer de mama triple negativo para los receptores ER-, PR-, HER2- como es la línea celular MDA-MB-231 y una línea celular positiva a ER+, PR+ como la línea celular MCF7. Hasta el momento, el mecanismo molecular por el cual EPO desencadena estos efectos no se ha dilucidado a detalle, por tal motivo resulta importante evaluar su participación en la progresión tumoral. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar si la eritropoyetina estaba involucrada en procesos de migración e invasión en células de cáncer de mama tanto metastásicas y no metastásicas (MDA-MB-231 y MCF7).

La metástasis tumoral consiste en una serie de procesos biológicos que mueven las células tumorales a una ubicación distante. Las células tumorales deben invadir el tejido que rodea el tumor primario, ingresar al torrente linfáticos o sanguíneo, sobrevivir y eventualmente extravasarse en un nuevo tejido y crecer en el nuevo sitio [83-84]. Se ha reportado que la activación del EPOR puede mejorar la migración en células de cáncer de mama [85] por lo tanto para establecer el potencial de la EPO en procesos metastásicos se determinó, en primera instancia la migración celular. Se encontró que la EPO es capaz de inducir una migración celular en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 a las concentraciones de 3, 5 y 7 UI/ml con un mayor efecto a las 5 UI/mL, por este motivo se decidió continuar los siguientes experimentos con esta concentración.

La unión de las integrinas a la MEC induce la agrupación de ellas en las adhesiones focales lo que permite la transmisión bidireccional de señales mecánicas y bioquímicas a través de la membrana plasmática para regular una variedad de funciones celulares, incluida la adhesión, migración, supervivencia, crecimiento y diferenciación [86]. La cinasa FAK es una proteína citoplásmica no receptora que controla una serie de vías de señalización celular, que incluyen proliferación, propagación celular, motilidad, angiogénesis, invasión y supervivencia. La cinasa FAK se sobreexpresa en muchos tipos de tumores, incluidos los tumores de cáncer de mama [87]. La cola citoplásmica de las integrinas b (b1, b3 y b5) facilita la autofosforilación de FAK en Y397. La autofosforilación en Y397 es un evento clave para la función biológica de FAK, ya que crea un sitio de unión de alta afinidad para proteínas con dominios SH2, incluidas las quinasas de la familia Src (c-Src, Fyn) [88-90], las quinasas de la familia Src fosforilan otros sitios de FAK en otros residuos de tirosina Y576 y Y577, y esto aumenta la actividad FAK [91-93].

Debido a que FAK juega un papel importante en la progresión tumoral, es de nuestro interés evaluar su activación, por lo tanto se evaluó la fosforilación de FAK en Y397 tras la estimulación con EPO. Se encontró que EPO indujo una fosforilación de FAK en Y397 en la línea celular MDA-MB-231 a los 5 y 15 minutos después de tratamiento con EPO lo que sugiere su participación en el ensamblaje y des

ensamblaje de contactos focales a un corto tiempo lo que le confiere a la célula capacidad de migración.

La metástasis es la principal causa de letalidad del cáncer; 90% de las muertes por tumores sólidos se pueden atribuir a diseminación metastásica [94]. La migración e invasión de las células a tejidos adyacentes e intravasación a vasos sanguíneos o linfáticos son necesarios para la metástastasis, las células cancerosas adquieren una fenotipo asociado con una mayor expresión de varios genes implicados en la motilidad celular; esto permite que las células cancerosas respondan a las señales del microambiente que desencadenan la invasión tumoral [95]. Durante el proceso de metástasis existen cambios en la adherencia de la célula tumoral a la matriz extracelular, degradación proteolítica del tejido circundante y cambios en la motilidad para impulsar físicamente a las células tumorales a través del tejido. Debido a lo anterior se decidió evaluar la capacidad de invasión celular de la línea celular MDA-MB-231 en un ensayo de invasión en cámara de boyden modificada con matrigel simulando con este último la matriz extracelular. Se realizó este ensayo con concentraciones de 5 y 7 UI/mL ya que se ha reportado que EPO a estas concentraciones es capaz de inducir invasión celular en una línea celular de epitelio mamario MCF10A [96]. Se encontró que las células MDA-MB-231 tienen una mayor capacidad de invadir a una concentración de 7 UI/mL y no a la de 5 UI/mL en el caso de la migración celular, lo que indica que se podrían estar activando diferentes vías de señalización celular involucradas en invasión celular a una concentración de 7 UI/mL. Es importante considerar que estos experimentos se realizaron en células MDA-MB-231 con un potencial metastásico por lo tanto demostramos fuertemente que EPO exacerba esta capacidad.

Durante el proceso de migración e invasión celular existen cambios en la adherencia de la célula tumoral a la matriz extracelular, organización de sus componentes, degradación proteolítica del tejido circundante a través de la producción de MMPs. Las MMPs son una familia de endopeptidasas neutras dependientes de Zn^{2+} que se han asociado con la invasión de células tumorales y migración debido a su capacidad para hidrolizar varios componentes de la MEC [97]. La MEC es una red

compleja compuesta de componentes proteicos, incluidos los colágenos y elastina, glicoproteínas tales como laminina, fibronectina y nidogen, así como varios proteoglicanos y glicosaminoglicanos, que juntos construyen la arquitectura de las membranas basales e intersticiales [98]. Las MMPs contribuyen sustancialmente a otros pasos en la cascada metastásica, como angiogénesis, diferenciación, proliferación, y apoptosis [63,99-100]. Las MMPs o gelatinasas, incluyen las MMP 2 (gelatinasa A) y MMP 9 (gelatinasa B), ambas tienen la habilidad para degradar el colágeno IV, colágenos I, V y X y laminina 5 [101-103]. Los niveles elevados de MMPs 2 y/o MMPs 9 se encuentran asociados en el cáncer de mama y su expresión y actividad a menudo se asocian con agresividad tumoral y un mal pronóstico de los pacientes con cáncer [104-105], debido a ello se evaluó el efecto de EPO en la secreción de MMP 2 y 9 en la línea celular MDA-MB-231. Se encontró que el estímulo de EPO induce un incremento en la secreción de MMPs a concentraciones de 1, 3, 5 y 7. Estos datos apoyan fuertemente el efecto de EPO en células de cáncer de mama para promover invasión.

En TEM la plasticidad epitelial y la adquisición de propiedades invasivas sin un compromiso total a un fenotipo mesenquimal son críticos en el desarrollo, especialmente durante la morfogénesis de ramificación en la glándula mamaria [106], pero también en procesos de metástasis, las células epiteliales adquieren el fenotipo similar a fibroblastos y muestran una adhesión intercelular reducida y movilidad mejorada [107-108]. La TEM desencadena la desestabilización secuencial de uniones adhesivas célula-célula y maquinaria reguladora que controla la polaridad celular [109]. Las uniones adherentes se ensamblan en varios pasos secuenciales, después de una etapa de dimerización lateral, la unión homofílica de cadherinas entre células adyacentes genera una adhesión débil. Se requiere la formación de un complejo que involucre al Ca^{2+}, cateninas y otras moléculas que se unen al citoesqueleto de actina para obtener una fuerte adhesión, una forma de reducir la fuerza de la célula es la disminución de la cantidad de proteína E-cadherina, este evento se ha reportado en varios tipos de cáncer [110-111].

Se evaluaron proteínas involucradas en TEM como la desregulación de una proteína de fenotipo epitelial (E-cadherina) y una proteína de fenotipo mesenquimal (N-cadherina). En general, se encontró que la EPO es capaz disminuir la expresión de E-cadherina a los 15 minutos, 6 y 9 horas y por otro lado un incremento de N-cadherina a las 6 horas, existen reportes que indican que durante TEM se pierde la expresión de la proteína E-cadherina, mientras que se induce la expresión de la proteína N-cadherina, un proceso también conocido como el recambio de cadherinas [112- 113].

Por supuesto son muchas interrogantes las que surgen en base al planteamiento anterior, una en particular es ¿cuál es el efecto de la EPO sobre la expresión diferencial de genes?, un modelo propuesto para explicar esta interrogante es un análisis de la expresión genética por medio de microarreglos. En general se encontró que existe una desregulación en genes tras el estímulo con EPO, algunos de ellos están involucrados en la TEM y algunos otros en viabilidad, proliferación, supervivencia celular, sin embargo hace falta de un análisis más robusto para una mayor comprensión de estos resultados.

X. CONCLUSIÓN

El estímulo con eritropoyetina incrementa la migración e invasión en células de cáncer de mama metastásicas MDA-MB-231. Por otro lado, eritropoyetina promueve la adquisición de un fenotipo mesenquimal en células de cáncer de mama no metástasis MCF7, induciendo un proceso de migración celular, así como incrementando la expresión del marcador mesenquimal N-cadherina y regulando negativamente la expresión del marcador epitelial E-cadherina. Finalmente, EPO induce una desregulación en la expresión de genes en la línea celular MCF7. En conclusión, nuestros datos sugieren que EPO participa en la progresión tumoral en células de cáncer de mama.

XI. BIBLIOGRAFÍA

[1] L. Hennighausen and G. W. Robinson, “Think globally, act locally: the making of a

mouse mammary gland," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 301, pp. 449–455, 1998.

[2] G. W. Robinson, "Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 12, pp. 963–972, 2007.

[3] L. Hennighausen and G. W. Robinson, "Information networks in the mammary gland," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 9, pp. 715–725, 2005.

[4] B. S. Wiseman, "Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer," *Science (80-.).*, vol. 296, no. 5570, pp. 1046–1049, 2002.

[5] K. Polyak and R. Kalluri, "The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer.," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, no. 11, p. a003244, 2010.

[6] J. M. Gray, S. Rasanayagam, C. Engel, and J. Rizzo, "State of the evidence 2017: An update on the connection between breast cancer and the environment," *Environmental Health: A Global Access Science Source*, vol. 16, no. 1. 2017.

[7] C. Vallejos, H. Gómez, W. Cruz, J. Pinto, R. Dyer, R. Velarde, J. Suazo, S. Neciosup, M. León, M. De La Cruz, and C. Vigil, "Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: Subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database," *Clin. Breast Cancer*, vol. 10, no. 4, pp. 294–300, 2010.

[8] J. L. Quirós-alpízar, Y. Jiménez-rodríguez, E. J. Montero, and M. Monge-, "Original Triple Negative Invasive Breast Carcinoma : Incidence and Clinical - Pathological Characteristics," pp. 2–6, 2010.

[9] C. González, Jéssica; Ugalde, "LA GLÁNDULA MAMARIA, EMBRIOLOGÍA, HISTOLOGÍA, ANATOMÍA Y UNA DE SUS PRINCIPALES PATOLOGÍAS, EL CÁNCER DE MAMA," *Rev. medica costa rica y Centroam. LXIX*, vol. 2, no. 602, pp. 317–320, 2012.

[10] T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lonning, P. O. Brown, A.-L. Borresen-Dale, and D. Botstein, "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 14, pp. 8418–8423, 2003.

[11] V. Perez Sanchez, T. Vela Chavez, and a Mora Tiscareño, “Diagnóstico histopatológico y factores pronóstico en cáncer infiltrante de glándula mamaria,” *Rev. Inst. Nac. Cancerol. (Mex).*, vol. 3, no. 1, pp. 7–17, 2008.

[12] D. Ford, D. F. Easton, M. Stratton, S. Narod, D. Goldgar, P. Devilee, D. T. Bishop, B. Weber, G. Lenoir, J. Chang-Claude, H. Sobol, M. D. Teare, J. Struewing, A. Arason, S. Scherneck, J. Peto, T. R. Rebbeck, P. Tonin, S. Neuhausen, R. Barkardottir, J. Eyfjord, H. Lynch, B. A. J. Ponder, S. A. Gayther, J. M. Birch, A. Lindblom, D. Stoppa-Lyonnet, Y. Bignon, A. Borg, U. Hamann, N. Haites, R. J. Scott, C. M. Maugard, H. Vasen, S. Seitz, L. A. Cannon-Albright, A. Schofield, and M. Zelada-Hedman, “Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 62, no. 3, pp. 676–689, 1998.

[13] M.-C. King, J. H. Marks, J. B. Mandell, and New York Breast Cancer Study Group, “Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2.,” *Science*, vol. 302, no. 5645, pp. 643–6, 2003.

[14] J. V Lacey Jr., A. R. Kreimer, S. S. Buys, P. M. Marcus, S. C. Chang, M. F. Leitzmann, R. N. Hoover, P. C. Prorok, C. D. Berg, P. Hartge, L. C. Prostate, and T. Ovarian Cancer Screening Trial Project, “Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort,” *BMC Cancer*, vol. 9, p. 84, 2009.

[15] M. Pollán, M. (2010). Epidemiology of breast cancer in young women. Breast Cancer Research and Treatment, 123 Suppl , 3–6. doi:10.1007/s10549-010-1098-2Pollán, “Epidemiology of breast cancer in young women.,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 123 Suppl, pp. 3–6, 2010.

[16] V. W. Setiawan, C. A. Haiman, F. Z. Stanczyk, L. Le Marchand, and B. E. Henderson, “Racial/ethnic differences in postmenopausal endogenous hormones: The Multiethnic Cohort Study,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 15, no. 10, pp. 1849–1855, 2006.

[17] J. Lee, B. A. Olofsson, A. Mwidau, M. Escudero, E. Flemington, J. Azizkhan-, R. J. Ferrante, R. R. Ratan, H. Ryu, J. Lee, B. A. Olofsson, A. Mwidau, A. Dedeoglu, M. Escudero, E. Flemington, J. Azizkhan-clifford, R. J. Ferrante, R. R. Ratan, L. Fan, B. W. Busser, and T. Q. Lifsted, “Hoon Ryu, Junghee Lee, Beatrix A. Olofsson, Aziza

Mwidau, Alpaslan Dedeoglu, Maria Escudero, Erik Flemington, Jane Azizkhan-Clifford, Robert J. Ferrante, and Rajiv R. Ratan," vol. 100, no. 11, 2003.

[18] P. Anand, A. B. Kunnumakara, C. Sundaram, K. B. Harikumar, S. T. Tharakan, O. S. Lai, B. Sung, and B. B. Aggarwal, "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes," *Pharmaceutical Research*, vol. 25, no. 9. pp. 2097–2116, 2008.

[19] A. Grossi, F. Balestri, and S. Santini, "Darbepoetin alpha in the treatment of cancer chemotherapy-induced anemia," *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol. 3, no. 2. pp. 269–275, 2007.

[20] C. F. Joaquín, "Hematología para el químico y el patólogo clínicos." pp. 39–44, 2008.

[21] Organizacion Mundial de la Salud, "Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad," *VMNIS*, vol. 11.1, p. 7, 2011.

[22] F. K. Lin, S. Suggs, C. H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, and Z. Stabinsky, "Cloning and expression of the human erythropoietin gene.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. 22, pp. 7580–4, 1985.

[23] C. Bokemeyer, M. S. Aapro, a Courdi, J. Foubert, H. Link, a Osterborg, L. Repetto, and P. Soubeyran, "EORTC Guidelines for the Use of Erythropoeitic Proteins in Anaemic Patients with Cancer: 2006 Update," *Eur. J. Cancer*, vol. 43, pp. 258–70, 2006.

[24] L. Cabrera Garcia, B. Ruíz Antorán, and a Sancho López, "Eritropoyetina : revisión de sus indicaciones," *Rev. Univ. Puerta Hierro Madrid*, vol. 33, p. 7, 2009.

[25] K. M. Moritz, G. B. Lim, and E. M. Wintour, "Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis.," *Am. J. Physiol.*, vol. 273, no. 6 Pt 2, pp. R1829-44, 1997.

[26] H. Ludwig, S. Van Belle, P. Barrett-Lee, G. Birgegård, C. Bokemeyer, P. Gascón, P. Kosmidis, M. Krzakowski, J. Nortier, P. Olmi, M. Schneider, and D. Schrijvers, "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*, vol. 40, no. 15, pp. 2293–2306, 2004.

[27] M. Aapro, W. Jelkmann, S. N. Constantinescu, and B. Leyland-Jones, "Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 106, no. 7. pp. 1249–1258, 2012.

[28] S. S. Jones, A. D. D'Andrea, L. L. Haines, and G. G. Wong, "Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization.," *Blood*, vol. 76, no. 1, pp. 31–5, 1990.

[29] A. M. Sinclair, N. Rogers, L. Busse, I. Archibeque, W. Brown, P. D. Kassner, J. E. V. Watson, G. E. Arnold, K. C. Q. Nguyen, S. Powers, and S. Elliott, "Erythropoietin receptor transcription is neither elevated nor predictive of surface expression in human tumour cells," *Br. J. Cancer*, vol. 98, no. 6, pp. 1059–1067, 2008.

[30] A. Österborg, M. Aapro, P. Cornes, A. Haselbeck, C. R. W. Hayward, and W. Jelkmann, "Preclinical studies of erythropoietin receptor expression in tumour cells: Impact on clinical use of erythropoietic proteins to correct cancer-related anaemia," *Eur. J. Cancer*, vol. 43, no. 3, pp. 510–519, 2007.

[31] K. K. Chan, K. B. Matchett, J. A. Coulter, H.-F. Yuen, C. M. McCrudden, S.-D. Zhang, G. W. Irwin, M. A. Davidson, T. Rülicke, S. Schober, L. Hengst, H. Jaekel, A. Platt-Higgins, P. S. Rudland, K. I. Mills, P. Maxwell, M. El-Tanani, and T. R. Lappin, "Erythropoietin drives breast cancer progression by activation of its receptor EPOR," *Oncotarget*, vol. 8, no. 24, pp. 38251–38263, 2015.

[32] J. Bohlius, J. Wilson, J. Seidenfeld, M. Piper, G. Schwarzer, J. Sandercock, S. Trelle, O. Weingart, S. Bayliss, B. Djulbegovic, C. L. Bennett, S. Langensiepen, C. Hyde, and A. Engert, "Recombinant human erythropoietins and cancer patients: Updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 98, no. 10, pp. 708–714, 2006.

[33] B. Leyland-Jones, V. Semiglazov, M. Pawlicki, T. Pienkowski, S. Tjulandin, G. Manikhas, A. Makhson, A. Roth, D. Dodwell, J. Baselga, M. Biakhov, K. Valuckas, E. Voznyi, X. Liu, and E. Vercammen, "Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: A survival study," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 25, pp. 5960–

5972, 2005.

[34] S. Elliott, E. Pham, and I. C. Macdougall, “Erythropoietins: A common mechanism of action,” *Experimental Hematology*, vol. 36, no. 12. pp. 1573–1584, 2008.

[35] O. Andrés, P. B. Md, L. A. Gómez, and R. Bact, “Eritropoyetina: Más Allá De La Proliferación Y Maduración Eritroide,” *Revista*, vol. 18, no. 1, pp. 67–76, 2010.

[36] H. Franklin Bunn, “Erythropoietin,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 2, 2013.

[37] N. Debeljak, P. Solár, and A. J. Sytkowski, “Erythropoietin and cancer: The unintended consequences of anemia correction,” *Frontiers in Immunology*, vol. 5, no. NOV. 2014.

[38] C. Michiels, E. Minet, G. Michel, D. Mottet, J. Piret, and M. Raes, “HIF-1 and AP-1 Cooperate to Increase Gene Expression in Hypoxia : Role of MAP Kinases,” pp. 49–53, 2001.

[39] V. H. Haase, “Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors,” *Blood Rev.*, vol. 27, no. 1, pp. 41–53, 2013.

[40] L. J. shen Huang, 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*, vol. 8, no. 6, pp. 1327–1338, 2001.

[41] N. Trošt, N. Hevir, T. L. Rižner, and N. Debeljak, “Correlation between erythropoietin receptor(s) and estrogen and progesterone receptor expression in different breast cancer cell lines,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 31, no. 3, pp. 717–725, 2013.

[42] W. Jelkmann and K. Wagner, “Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin,” *Annals of Hematology*, vol. 83, no. 11. pp. 673–686, 2004.

[43] A.-L. Siren, M. Fratelli, M. Brines, C. Goemans, S. Casagrande, P. Lewczuk, S. Keenan, C. Gleiter, C. Pasquali, A. Capobianco, T. Mennini, R. Heumann, A. Cerami, H. Ehrenreich, and P. Ghezzi, “Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 7, pp. 4044–4049, 2001.

[44] B. Y. Lee, P. Timpson, L. G. Horvath, and R. J. Daly, “FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 146, pp. 132–149, 2015.

[45] P. Friedl and K. Wolf, “Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 362–374, 2003.

[46] J. D. Hood and D. A. Cheresh, “ROLE OF INTEGRINS IN CELL INVASION AND MIGRATION,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 2, pp. 91–100, 2002.

[47] A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz, “Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back,” *Science*, vol. 302, no. 5651. pp. 1704–1709, 2003.

[48] S. K. Mitra, D. A. Hanson, and D. D. Schlaepfer, “Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, no. 1, pp. 56–68, 2005.

[49] X. D. Ren, W. B. Kiosses, D. J. Sieg, C. a Otey, D. D. Schlaepfer, and M. a Schwartz, “Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover.,” *J. Cell Sci.*, vol. 113, pp. 3673–3678, 2000.

[50] D. J. Webb, K. Donais, L. A. Whitmore, S. M. Thomas, C. E. Turner, J. T. Parsons, and A. F. Horwitz, “FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 2, pp. 154–161, 2004.

[51] S. K. Mitra and D. D. Schlaepfer, “Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 18, no. 5. pp. 516–523, 2006.

[52] K. T. Chan, C. L. Cortesio, and A. Huttenlocher, “Fak alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion,” *J. Cell Biol.*, vol. 185, no. 2, pp. 357–370, 2009.

[53] X. Zhao and J.-L. Guan, “Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 8, pp. 610–615, 2011.

[54] M. Björklund and E. Koivunen, “Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells,” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1755, no. 1. pp. 37–69, 2005.

[55] S. L. Parsons, S. A. Watson, H. M. Collins, N. R. Griffin, P. A. Clarke, and R. J. Steele, “Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy.,” *Br. J. Cancer*, vol. 78, no. 11, pp. 1495–502, 1998.

[56] A. Jezierska and T. Motyl, “Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review.,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 15, no. 2, p. RA32-A40, 2009.

[57] M. C. Angosto and J. Á. Álvarez-Gómez, “Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer,” *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 76, no. 1. pp. 59–84, 2010.

[58] M. Egeblad and Z. Werb, “New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 161–174, 2002.

[59] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, “Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, no. 3. pp. 178–196, 2014.

[60] D. D’Eliseo, G. Di Rocco, R. Loria, S. Soddu, A. Santoni, and F. Velotti, “Epitelial-to-mesenchimal transition and invasion are upmodulated by tumor-expressed granzyme B and inhibited by docosahexaenoic acid in human colorectal cancer cells,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 35, no. 1, pp. 1–11, 2016.

[61] Z. Tan, C. Wang, X. Li, and F. Guan, “Bisecting N-Acetylglucosamine Structures Inhibit Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells,” *Front. Physiol.*, vol. 9, no. March, pp. 1–15, 2018.

[62] D. Li, Y. Zhang, H. Zhang, C. Zhan, X. Li, T. Ba, Z. Qiu, F. E, G. Lv, C. Zou, C. Wang, L. Si, C. Zou, Q. Li, and X. Gao, “CADM2, as a new target of miR-10b, promotes tumor metastasis through FAK/AKT pathway in hepatocellular carcinoma,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 37, no. 1, p. 46, 2018.

[63] D. C. Radisky, “Epithelial-mesenchymal transition.,” *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 19, pp. 4325–6, 2005.

[64] J. M. Lee, S. Dedhar, R. Kalluri, and E. W. Thompson, “The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease,” *Journal of Cell Biology*, vol. 172, no. 7. pp. 973–981, 2006.

[65] C. Scheel and R. A. Weinberg, “Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal

transition: Concepts and molecular links," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 22, no. 5–6. pp. 396–403, 2012.

[66] E. Batlle, E. Sancho, C. Francí, D. Domínguez, M. Monfar, J. Baulida, and A. G. De Herreros, "The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 84–89, 2000.

[67] M. Takeichi, "Cadherins: a molecular family essential for selective cell-cell adhesion and animal morphogenesis," *Trends Genet.*, vol. 3, no. C, pp. 213–217, 1987.

[68] T. T. Onder, P. B. Gupta, S. A. Mani, J. Yang, E. S. Lander, and R. A. Weinberg, "Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 10, pp. 3645–3654, 2008.

[69] M. T. Nieman, R. S. Prudoff, K. R. Johnson, and M. J. Wheelock, "N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression.," *J. Cell Biol.*, vol. 147, no. 3, pp. 631–644, 1999.

[70] R. B. Hazan, G. R. Phillips, R. F. Qiao, L. Norton, and S. A. Aaronson, "Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis.," *J. Cell Biol.*, vol. 148, no. 4, pp. 779–90, 2000.

[71] B. Volgger, K. Kurz, K. Zöschg, I. Theurl, A. Ciresá-König, C. Marth, and G. Weiss, "Importance of erythropoetin receptor expression in tumour tissue for the clinical course of breast cancer," *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 9, pp. 3721–3726, 2010.

[72] S. Elliott, J. Egrie, J. Browne, T. Lorenzini, L. Busse, N. Rogers, and I. Ponting, "Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate," *Exp. Hematol.*, vol. 32, no. 12, pp. 1146–1155, 2004.

[73] J. Vansteenkiste, R. Pirker, B. Massuti, F. Barata, A. Font, M. Fiegl, S. Siena, J. Gateley, D. Tomita, A. B. Colowick, J. Musil, and G. Aranesp 980297 Study, "Double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of darbepoetin alfa in lung cancer patients receiving chemotherapy," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, pp. 1211–1220, 2002.

[74] D. Kuhrt and D. M. Wojchowski, "Emerging EPO and EPO receptor regulators and signal transducers," *Blood*, vol. 125, no. 23. pp. 3536–3541, 2015.

[75] M. Aapro, R. C. Leonard, A. Barnadas, M. Marangolo, M. Untch, N. Malamos, J.

Mayordomo, D. Reichert, J. L. Pedrini, L. Ukarma, A. Scherhag, and H. U. Burger, “Effect of once-weekly epoetin beta on survival in patients with metastatic breast cancer receiving anthracyclineand/or taxane-based chemotherapy: Results of the Breast Cancer - Anemia and the Value of Erythropoietin (BRAVE) study,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 4, pp. 592–598, 2008.

[76] C. Aguilar, C. Aguilar, R. Lopez-marure, A. Jiménez-sánchez, L. Rocha-zavaleta, and C. Sección, “Co-stimulation with stem cell factor and erythropoietin enhances migration of c-Kit expressing cervical cancer cells through the sustained activation of ERK1 / 2,” pp. 1895–1902, 2014.

[77] B. Zhou, J. S. Damrauer, S. T. Bailey, T. Hadzic, Y. Jeong, K. Clark, C. Fan, L. Murphy, C. Y. Lee, M. A. Troester, C. R. Miller, J. Jin, D. Darr, C. M. Perou, R. L. Levine, M. Diehn, and W. Y. Kim, “Erythropoietin promotes breast tumorigenesis through tumor-initiating cell self-renewal,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 2, pp. 553–563, 2014.

[78] B. D. Hedley, J. E. Chu, D. G. Ormond, M. S. Beausoleil, A. Boasie, A. L. Allan, and A. Xenocostas, “Recombinant human erythropoietin in combination with chemotherapy increases breast cancer metastasis in preclinical mouse models.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 19, pp. 6151–62, 2011.

[79] M. Todaro, A. Turdo, M. Bartucci, F. Iovino, R. Dattilo, M. Biffoni, G. Stassi, G. Federici, R. De Maria, and A. Zeuner, “Erythropoietin activates cell survival pathways in breast cancer stem-like cells to protect them from chemotherapy,” *Cancer Res.*, vol. 73, no. 21, pp. 6393–6400, 2013.

[80] Z. Shi, V. M. Hodges, E. A. Dunlop, M. J. Percy, A. P. Maxwell, M. El-Tanani, and T. R. J. Lappin, “Erythropoietin-Induced Activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK Pathways Promotes Malignant Cell Behavior in a Modified Breast Cancer Cell Line,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 615–626, 2010.

[81] A. J. Sytkowski, “Does erythropoietin have a dark side? Epo signaling and cancer cells.,” *Science’s STKE : signal transduction knowledge environment*, vol. 2007, no. 395. 2007.

[82] V. Pelekanou, M. Kampa, M. Kafousi, K. Dambaki, K. Darivianaki, T. Vrekoussis, E. Sanidas, D. D. Tsiftsis, E. N. Stathopoulos, and E. Castanas, “Erythropoietin and its

receptor in breast cancer: Correlation with steroid receptors and outcome," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 16, no. 10, pp. 2016–2023, 2007.

[83] P. S. Steeg, "Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 8. pp. 895–904, 2006.

[84] M. Yilmaz and G. Christofori, "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 28, no. 1–2. pp. 15–33, 2009.

[85] R. D. Lester, M. Jo, W. M. Campana, and S. L. Gonias, "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 *," vol. 280, no. 47, pp. 39273–39277, 2005.

[86] J. Guan, "Critical Review Integrin Signaling Through FAK in the Regulation of Mammary Stem Cells and Breast Cancer," vol. 62, no. April, pp. 268–276, 2010.

[87] V. M. Golubovskaya, K. Conway-dorsey, S. N. Edmiston, C. Tse, A. A. Lark, C. A. Livasy, D. Moore, R. C. Millikan, and W. G. Cance, "SHORT REPORT FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer."

[88] M. Toutant, A. Costa, J. Studler, and G. Kadare, "Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation," vol. 22, no. 22, pp. 7731–7743, 2002.

[89] M. B. Calalb and T. R. Polte, "Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase at Sites in the Catalytic Domain Regulates Kinase Activity : a Role for Src Family Kinases," vol. 15, no. 2, pp. 954–963, 1995.

[90] J. T. Parsons, "Focal adhesion kinase : the first ten years," 2003.

[91] M. Toutant, J. Studler, F. Burgaya, A. Costa, and P. Ezan, "Autophosphorylation of Tyr 397 and its phosphorylation by Src-family kinases are altered in focal-adhesion-kinase neuronal isoforms '," vol. 128, pp. 119–128, 2000.

[92] H. Chen, P. A. Appeddu, H. Isoda, and J. Guan, "Phosphorylation of Tyrosine 397 in Focal Adhesion Kinase Is Required for Binding Phosphatidylinositol 3-Kinase *," vol. 271, no. 42, pp. 26329–26334, 1996.

[93] S. K. Mitra, D. A. Hanson, and D. D. Schlaepfer, "Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6,

no. 1. pp. 56–68, 2005.

[94] N. Kramer, A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, and M. Hengstschla, “Mutation Research / Reviews in Mutation Research In vitro cell migration and invasion assays,” vol. 752, pp. 10–24, 2013.

[95] H. Yamaguchi, J. Wyckoff, and J. Condeelis, “Cell migration in tumors,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 17, no. 5 SPEC. ISS. pp. 559–564, 2005.

[96] A. Ordoñez-Moreno, C. Rodriguez-Monterrosas, P. Cortes-Reynosa, J. I. Perez-Carreon, and E. Perez Salazar, “Erythropoietin Induces an Epithelial to Mesenchymal Transition-Like Process in Mammary Epithelial Cells MCF10A,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 118, no. 9, pp. 2983–2992, 2017.

[97] P. Delvenne, “Activated forms o f M M P 2 and MMP 9 in abdominal aortic aneurysms,” pp. 127–133.

[98] M. Corbel, “Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury,” vol. 33, pp. 749–754, 2000.

[99] Y.-C. Liao, Y.-W. Shih, C.-H. Chao, X.-Y. Lee, and T.-A. Chiang, “Involvement of the ERK Signaling Pathway in Fisetin Reduces Invasion and Migration in the Human Lung Cancer Cell Line A549,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 19, pp. 8933–8941, 2009.

[100] I. J. Fidler and M. L. Kripke, “The challenge of targeting metastasis,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 34, no. 4, pp. 635–641, 2015.

[101] I. Stamenkovic, “Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 415–433, 2000.

[102] A. B. Wysocki and L. Staiano-coico, “Wound Fluid from Chronic Leg Ulcers Contains Elevated Levels of Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 101, no. 1, pp. 64–68, 1993.

[103] B. Resorption and B. Ke, “Calvaria : Association of MMP Induction with,” vol. 139, no. 3, pp. 1338–1345, 2018.

[104] B. Bauvois, “Biochimica et Biophysica Acta New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers : Outside-in signaling and

relationship to tumor progression," *BBA - Rev. Cancer*, vol. 1825, no. 1, pp. 29–36, 2012.

[105] "Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers," vol. 87, pp. 287–297, 2005.

[106] D. S. Micalizzi, S. M. Farabaugh, and H. L. Ford, "Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 15, no. 2. pp. 117–134, 2010.

[107] Y. Qiao, C. Shiue, J. Zhu, T. Zhuang, and P. Jonsson, "AP-1-mediated chromatin looping regulates ZEB2 transcription : new insights into TNFα-induced epithelial – mesenchymal transition in triple-negative breast cancer," vol. 6, no. 10, pp. 7804–7814.

[108] D. Olmeda and A. Cano, "Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?," vol. 7, no. June, 2007.

[109] R. Y.-J. Huang, P. Guilford, and J. P. Thiery, "Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 19, pp. 4417–4422, 2012.

[110] P. Savagner, "Leaving the neighborhood: Molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition," *BioEssays*, vol. 23, no. 10, pp. 912–923, 2001.

[111] N. Matsuo, H. Shiraha, T. Fujikawa, N. Takaoka, N. Ueda, S. Tanaka, S. Nishina, Y. Nakanishi, M. Uemura, A. Takaki, S. Nakamura, Y. Kobayashi, K. Nouso, T. Yagi, and K. Yamamoto, "Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma," *BMC Cancer*, vol. 9, 2009.

[112] D. Medici, E. D. Hay, and B. R. Olsen, "Snail and Slug Promote Epithelial-Mesenchymal Transition through -Catenin-T-Cell Factor-4-dependent Expression of Transforming Growth Factor- 3," *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 11, pp. 4875–4887, 2008.

[113] J. P. Thiery and J. P. Sleeman, "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 2. pp. 131–142, 2006.