



**UNIVERSIDAD VERACRUZANA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“Efecto de la hormona de crecimiento en las propiedades de migración e
invasión de células cancerosas”**

TESIS

Como requisito para obtener el grado de
Doctora en Ciencias de la Salud

PRESENTA:

M. en C. Eugenia Marina Olascoaga Caso

DIRECCIÓN:

Dr. Enrique Juárez Aguilar

CODIRECCIÓN:

Dra. Elisa H. Tamariz Domínguez

Xalapa, Ver.

Junio de 2022.



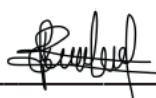
ACTA DE EXAMEN CERRADO

ACTA NÚMERO VEINTICINCO. En la Ciudad de Xalapa-Enríquez, Veracruz, México siendo las doce horas con treinta minutos del día diecisiete del mes de junio de dos mil veintidós, reunido el comité tutorial en la sala de juntas del Instituto de Ciencias de la Salud conformado este por: Dra. Elisa H. Tamariz Domínguez, Dra. Rebeca García Román, Dra. María Gabriela Nachón García, Dr. Jonathan García Román y Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba. Se procedió a examinar a la C. **Eugenia Marina Olascoaga Caso** alumna de la generación 2015-2018 y con matrícula S16017369, quien presentó la tesis titulada: “Efecto de la hormona de crecimiento en las propiedades de migración e invasión de células cancerosas”, como requisito para la presentación del examen abierto, dentro del programa del **Doctorado en Ciencias de la Salud**. Acto seguido el comité deliberó en privado y, una vez hecho esto, se procedió a hacer la votación acerca del resultado, habiéndose determinado por **unanimidad** que la C. **Eugenia Marina Olascoaga Caso** obtuvo la **aprobación** para la impresión de la tesis y la presentación del examen abierto, para la defensa de la misma. Posteriormente el comité en pleno procedió a notificar al alumno los resultados del examen cerrado, con las siguientes observaciones: atender las observaciones emitidas por el jurado en el documento de tesis y en la presentación. Firmado para constancia los que en el intervinieron, siendo las quince horas con diez minutos del día antes mencionado.

Comité Tutorial



Dra. Elisa Hortensia Tamariz Domínguez



Dra. Rebeca García Román



Dra. María Gabriela Nachón García



Dr. Jonathan García Román



Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba

Como siempre, lo dedico a mis padres. Por sembrar en mí la semilla del estudio y la superación profesional. Por enseñarme a ser independiente y perseverante, herramientas sin las que no hubiese podido terminar este ciclo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Dr. Enrique Juárez Aguilar, por la confianza para iniciar este proyecto y por crecer juntos a lo largo de este periodo, tanto en el quehacer científico como en lo personal. Le agradezco la confianza de permitirme desenvolverme a mi ritmo, siguiendo mi camino, pero siempre guiándome para no perderlo de vista. Le agradezco las tardes de pláticas interminables, que me mostraron a un ser humano cabal que siempre está en búsqueda del crecimiento personal y que gracias a eso he aprendido a ser autocrítica y fiel a mis convicciones. Le agradezco haber sido ese cable a tierra que me permitió desarrollar la templanza y fortaleza necesarias para solventar todos los altibajos que implica la ciencia. Le agradezco infinitamente por ser mi maestro y mi amigo.

A la M. en C. Eva Luz Montoya Hernández, por ser un apoyo y contrapeso en el día a día del desarrollo de esta tesis. Por su complicidad y cariño.

Al Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba, por enseñarme una perspectiva diferente de la ciencia y por confiar en mí y apoyarme, aún sin conocer mi trabajo previamente. Gracias por su amistad.

A mis asesores, la Dra. Elisa Tamariz Domínguez, la Dra. Isaura Meza Gómez-Palacio, la Dra. Rebeca García Román, la Dra. Gabriela Nachón García y el Dr. Jonathan García Román, por siempre tener la disposición de apoyarme y retroalimentar mi trabajo. Agradezco sus comentarios y sus aportaciones para la mejora de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del posgrado, el Dr. Juan David Olivares Hernández y la M. en C. Ana M. Vela Alcántara, por todo el apoyo técnico, la complicidad, la amistad y el acompañamiento que aligeraron este camino.

A mis asesorados y amigos del laboratorio Rubén Alejandro Fuentes Pascacio, Mariana Villegas Santiago y Hazel Castillo, por su confianza, por su amistad y por hacerme reír tanto.

RESUMEN

La transición epitelio-mesénquimal (TEM) es un proceso de múltiples etapas en el que las células epiteliales adquieren características mesénquimales. En el cáncer, la TEM está relacionada con la iniciación del tumor, la metástasis y la resistencia a la quimioterapia. La hormona del crecimiento (GH) se ha asociado con la progresión del melanoma, cáncer de mama, colorrectal y endometrial principalmente a través de una regulación autocrina/paracrina de diversos procesos biológicos, incluida la TEM. Sin embargo, se desconoce el papel de la GH exógena en la TEM de las células de cáncer de cuello uterino. Además, se desconoce si la GH puede promover la TEM en células cancerosas y no cancerosas. En el presente estudio mostramos que la GH (100 ng/mL) mejora la dispersión celular y la tasa migratoria y produce cambios morfológicos como el aumento del área celular y la formación de filamentos del citoesqueleto de actina en la línea celular de cáncer de cuello uterino, HeLa. Además, encontramos que, en estas células, la GH favorece la expresión de la proteína mesénquimal vimentina, seguida de un aumento de la expresión de la proteína epitelial E-cadherina. Estos resultados sugieren que la GH exógena induce un fenotipo híbrido epitelial-mesénquimal en las células HeLa. Diversos estudios indican que el fenotipo híbrido se relaciona con una forma más eficiente para hacer metástasis que el fenotipo mesénquimal. En las células no cancerosas HEK293, la GH solo promovió cambios morfológicos, incluido el incremento del área celular y la formación de filopodios, pero no afectó la dispersión, la migración, ni la expresión de marcadores de TEM, lo que sugiere que la GH favorece la metástasis a través de la TEM solo en etapas avanzadas del cáncer, pero no afectan a la TEM durante las etapas iniciales.

PALABRAS CLAVE. Hormona de crecimiento, Células de cáncer cervical, HeLa, Células HEK293, Transición epitelio-mesénquimal.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ESFE	Sociedad europea de endocrinología pediátrica
FDA	Administración de alimentos y drogas
FT-TEM	Factores de transcripción inductores de la transición epitelial-mesenquimal
GHRH	Hormona liberadora de hormona de crecimiento
GH	Hormona de crecimiento
GHR	Receptor de la hormona de crecimiento
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
MitC	Mitomomicina C
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PES	Sociedad de endocrinología pediátrica
PFA	Paraformaldehído
RA	Receptor de andrógenos
RR	Riesgo relativo
SFB	Suero fetal de bovino
SIR	Tasa de incidencia estandarizada
TEM	Transición epitelial-mesenquimal
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1. Aspectos generales del cáncer	3
1.1 Características de las células cancerosas.....	3
1.2 Modelos de progresión del cáncer: progresión paralela y lineal.....	5
1.3 La transición epitelial-mesenquimal como mecanismo de progresión del cáncer.....	7
2. El cáncer cervical	11
2.1 Oncogénesis y progresión del cáncer cervical	11
2.2 La transición epitelial-mesenquimal en las células de cáncer cervical	13
3. Hormona de crecimiento	14
3.1 Características y uso terapéutico de la hormona de crecimiento	14
3.2 La hormona de crecimiento y su asociación con el cáncer	17
3.3 La hormona de crecimiento y su relación con cáncer cervical.....	21
4. Modelo de estudio.....	21
4.1 La línea celular de cáncer cervical HeLa	21
4.2 La línea celular de epitelio normal embrionario HEK293	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
CAPÍTULO II.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Líneas celulares.....	25

Uso de EGF como control positivo	25
Tratamiento con HC	25
Ensayo de dispersión celular	26
Ensayo de reparación de la monocapa.....	27
Análisis de morfología y citoesqueleto celular mediante tinción con faloidina	28
Análisis de la expresión del GHR y de las proteínas E-cadherina y vimentina mediante citometría de flujo.....	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
CAPÍTULO III	31
RESULTADOS	31
Las células de cáncer cervical HeLa y las células epiteliales embrionarias HEK293 expresan al receptor de GH, pero solo la GH promueve la dispersión de células HeLa	31
La GH incrementa la migración de las células HeLa, pero no afecta a las células HEK293	33
La GH incrementa el área celular y promueven la formación de protusiones membranales en las células cancerosas HeLa y en las no cancerosas HEK293...	34
La GH potencia un fenotipo híbrido epitelial-mesenquimal en las células cancerosas HeLa, pero no en las células no cancerosas HEK293	38
DISCUSIÓN.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelos lineal y paralelo de la progresión del cáncer	6
Figura 2. Cambios celulares y moleculares durante la transición epitelial- mesenquimal.	9
Figura 3. Progresión del cáncer cervical mediada por la infección del virus de papiloma humano.....	13
Figura 4. Vías de señalización involucradas en la TEM del cáncer cervical.....	16
Figura 5. Tanto la línea celular HEK293 como HeLa expresaron la proteína GHR durante la transferencia de subcultivos. Sin embargo, la GH promueve la dispersión solo de células HeLa	33
Figura 6. La hormona del crecimiento potencia la migración de las células cancerosas HeLa, pero no la de las no cancerosas HEK293.....	34
Figura 7. La GH promueve la formación de filamentos de actina tanto en células HEK293 como en HeLa.....	36
Figura 8. La GH aumenta el área de actina y la relación de aspecto y disminuye la circularidad y la redondez tanto en las células HeLa como en las células HEK293..	41
Figura 9. La GH potencia la expresión de vimentina, seguida de una inducción de un fenotipo híbrido epitelial-mesenquimal en células cancerosas HeLa, pero no afecta a las células no cancerosas HEK293.	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Moléculas de señalización involucradas en la activación o supresión de la TEM en el cáncer cervical	15
Cuadro 2. Concentraciones séricas de GH después del tratamiento con GH recombinante.....	18
Cuadro 3. Antecedentes del efecto de la expresión autocrina de GH (inducida mediante transfección) en la transición epitelial-mesenquimal de células cancerosas	20
Cuadro 4. Comparación del efecto biológico de la GH autocrina y exógena en líneas celulares de cáncer.....	20

INTRODUCCIÓN

La progresión del cáncer es un proceso complejo que involucra diferentes etapas, hasta llegar finalmente a la diseminación de las células cancerosas a otros tejidos, fenómeno conocido como metástasis. Los modelos de progresión que se han podido identificar son el modelo paralelo, el cual establece que las células son capaces de desprenderse y circular por el torrente sanguíneo o linfático desde antes de que se forme el tumor, en el sitio de lesión inicial. Y el modelo lineal, que establece que la progresión se lleva a cabo después de un periodo extenso en el cual ya se dio lugar al crecimiento de un tumor primario (Fabisiewicz *et al.*, 2020). En ambos casos se conoce que existe un mecanismo que puede favorecer la migración de las células hacia otros tejidos y la supervivencia de las mismas en la circulación. Este mecanismo es la Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) (Diepenbruck & Christofori, 2016; Nieto *et al.*, 2016; Pastushenko & Blanpain, 2019a).

La TEM inicia con la pérdida de las uniones célula-célula producidas al sustituir la proteína transmembranal E-cadherina y las integrinas epiteliales por las proteínas dinámicas N-cadherina e integrinas mesenquimales. Posteriormente, las células cancerosas se someten a una reorganización del citoesqueleto de actina, donde las fibras de estrés y las protuberancias de la membrana naciente reemplazan a la actina cortical. Además, los filamentos intermedios epiteliales típicos, como las citoqueratinas, son reemplazados por vimentina. Estos reemplazos conducen a modificaciones morfológicas de las células desde una forma poligonal a una morfología similar a la de los fibroblastos y permiten que las células cancerosas invadan la matriz extracelular y se propaguen a tejidos distantes. La TEM en las células cancerosas podría ser inducida por factores de señalización pleiotrópicos que influyen en la expresión de factores de transcripción específicos (Snail, Zeb y Twist), así como por citocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas de matriz y hormonas (Lamouille *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2016; Ye & Weinberg, 2015).

Recientemente, se ha sugerido que la hormona de crecimiento (GH), sintetizada localmente, induce la TEM parcial o total en células cancerosas de melanoma, mama, colorrectal, endometrio y páncreas (revisado por Brittain *et al.*, 2017). Sin embargo, no existe evidencia sobre los efectos de la GH exógena en la TEM en otros tipos de cánceres considerando que su efecto podría diferir dependiendo de su fuente de origen (Nakonechnaya *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2005). Además, se desconoce si la GH puede promover la TEM por igual en células cancerosas y no cancerosas. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la GH exógena en los eventos relacionados con la TEM, incluida la dispersión celular, la migración, los cambios morfológicos y la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en la línea celular de cáncer de cuello uterino humano, HeLa y en la línea celular embrionaria de epitelio de riñón, HEK293.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Aspectos generales del cáncer

1.1 Características de las células cancerosas

El cáncer se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado y la propagación de células anormales (American Cancer Society, 2012). Este padecimiento se desarrolla en un proceso denominado carcinogénesis, que tradicionalmente se ha dividido en tres etapas, la iniciación, la promoción y la progresión. La fase de iniciación se caracteriza por un daño al ADN provocado por carcinógenos químicos, virus oncogénicos o mutaciones espontáneas que son consecuencia de errores en la replicación. En esta fase no se presentan cambios fenotípicos evidentes en las células. La fase de promoción es el resultado de la clonación de las células que poseen alteraciones genéticas, las cuales favorecen la formación de un tumor. Finalmente, la fase de progresión se caracteriza por una alta inestabilidad genética y se presenta un crecimiento tumoral acelerado aunado a la activación de mecanismos que les permiten a las células desprenderse del tumor primario y diseminarse hacia otros tejidos, fenómeno conocido como metástasis (Fang *et al.*, 2008).

Como consecuencia de la inestabilidad genética, las células cancerosas desarrollan nuevas habilidades y mecanismos para adaptarse a todos los cambios que ocurren tras la formación de un tumor. En el año 2011, Hanahan & Weinberg, describieron seis principales características que adquieren las células cancerosas y que les permite incrementar su malignidad. Como primer cambio adaptativo, las células cancerosas son capaces de desarrollar una *señalización proliferativa sostenida*. Para que la masa tumoral pueda crecer, requiere la activación constitutiva de señales de proliferación, a diferencia de las células normales que activan estas señales de manera transitoria. En condiciones normales, las señales de proliferación están reguladas negativamente por oncoproteínas -como *ras*, *myc* y *raf*- por lo que en las células cancerosas la desregulación de estas oncoproteínas conlleva a un estado de proliferación constante.

El segundo cambio adaptativo se refiere a la capacidad de *replicación inmortalizada*. Para que las células cancerosas puedan mantener la alta tasa proliferativa, requieren mantener una expresión constitutiva de la enzima telomerasa. Esta enzima es capaz de contrarrestar la erosión progresiva de los telómeros que se produce como resultado de la división celular y de esta manera, a diferencia de las células normales, las células cancerosas son capaces de tener un amplio número de ciclos celulares.

El tercer cambio adaptativo que desarrollan las células cancerosas es la *reprogramación del metabolismo energético*. Para cubrir los requerimientos energéticos y la alta demanda de macromoléculas que sostengan la alta tasa proliferativa, las células tumorales sufren una reprogramación energética, denominada efecto Warburg, en la que las células pasan de obtener sustratos energéticos a partir de fosforilación oxidativa a obtenerlos sólo mediante glicólisis, aún en presencia de oxígeno, por lo que se denomina glicólisis aeróbica. A pesar de la baja producción de adenosintrifosfato (ATP) que conlleva la glicólisis aerobia, este programa metabólico les permite abastecerse de otros macronutrientes de alta demanda como nucleósidos, aminoácidos y lípidos, mediante los intermediarios producidos en la glicólisis aerobia (Vander Heiden *et al.*, 2009).

El cuarto cambio adaptativo se refiere a la *resistencia a la muerte celular*. Como resultado del crecimiento del tumor, las células cancerosas experimentan un estrés fisiológico que induce la respuesta apoptótica. Sin embargo, se conoce que las células son capaces de evadir o atenuar la apoptosis y eso les permite progresar a un alto grado de malignidad y adquirir resistencia a la terapia médica. Las células tumorales utilizan una serie de estrategias que limitan la apoptosis, dentro de las más estudiadas se encuentra la pérdida de la función del supresor tumoral p53, incremento en la expresión de reguladores anti-apoptóticos *-Bcl-2* y *Bcl-xL-* y la disminución de factores pro-apoptóticos *-Bax, Bim* y *Puma-*.

El quinto cambio adaptativo corresponde a la *inducción de la angiogénesis*. Similar a las necesidades de los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como mecanismos para eliminar residuos metabólicos y dióxido de

carbono. Para cubrir estas necesidades, las células cancerosas activan señales que permite la formación constante de vasos sanguíneos, lo que se conoce como angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos circundantes al tumor permite el abastecimiento de oxígeno en condiciones de hipoxia, la cual es consecuencia de la baja difusión de oxígeno hacia el interior del tumor.

Finalmente, el sexto cambio adaptativo que ocurre en las células cancerosas es la *activación de mecanismos de metástasis*. Aunado a las habilidades anteriormente descritas, las células activan mecanismos que les permiten transitar hacia la metástasis. Para que este proceso inicie, las células cancerosas deben adquirir la capacidad de desprenderse del tumor primario, degradar la matriz extracelular e invadir el tejido adyacente al tumor; posteriormente, las células atraviesan las paredes de los vasos e ingresan al torrente sanguíneo o linfático para finalmente salir de los vasos e implantarse en algún nuevo tejido posibilitando el crecimiento de un nuevo tumor (Talmadge & Fidler, 2010; Vanharanta & Massagué, 2013).

1.2 Modelos de progresión del cáncer: progresión paralela y lineal

El proceso metastásico se ha descrito como una serie de pasos en cadena, a los cuales se les denomina cascada metastásica. Anteriormente se pensaba que para que un tumor iniciara la cascada metastásica, tenía forzosamente que trascurrir un largo periodo desde el inicio del daño al ADN de las células hasta el establecimiento del tumor primario. Y en la mayoría de los casos, se relacionaba con etapas terminales y estadios muy avanzados de la enfermedad. Sin embargo, actualmente se sabe que este proceso metastásico puede iniciarse desde etapas muy tempranas del desarrollo del cáncer. Esto se ha podido conocer debido a que, en pacientes con cánceres insipientes, se han detectado células cancerosas circulantes, con las características propias de una célula metastásica (Fabisiewicz *et al.*, 2020). Como consecuencia de estos hallazgos, se han establecido dos hipótesis sobre cómo las células cancerosas son capaces de diseminarse hacia otros tejidos.

El modelo de progresión lineal corresponde a la forma tradicional en donde las características metastásicas ocurren de forma gradual y después de años de formado el tumor (Figura 1A). El modelo lineal inicia a partir de la formación de un tumor primario que proviene de una lesión celular temprana, en donde algunas de las células son capaces de desprenderse del tumor y migrar hacia el tejido adyacente, para posteriormente ingresar a los vasos sanguíneos o linfáticos hasta su extravasación, para finalmente colonizar un nuevo tejido. En el modelo paralelo de progresión, la diseminación de las células ocurre en fases muy tempranas del desarrollo del cáncer, e incluso antes de que existan manifestaciones clínicas de un tumor (Figura 1B). En el modelo paralelo, desde el momento en el que se presenta la lesión celular temprana, algunas de estas células son capaces de ingresar al torrente sanguíneo o linfático. Las células que lograron ingresar a los vasos sanguíneos paralelamente forman nichos metastásicos y otras permanecen en un estado latente, mientras se da el crecimiento del tumor primario (Fabisiewicz *et al.*, 2020).

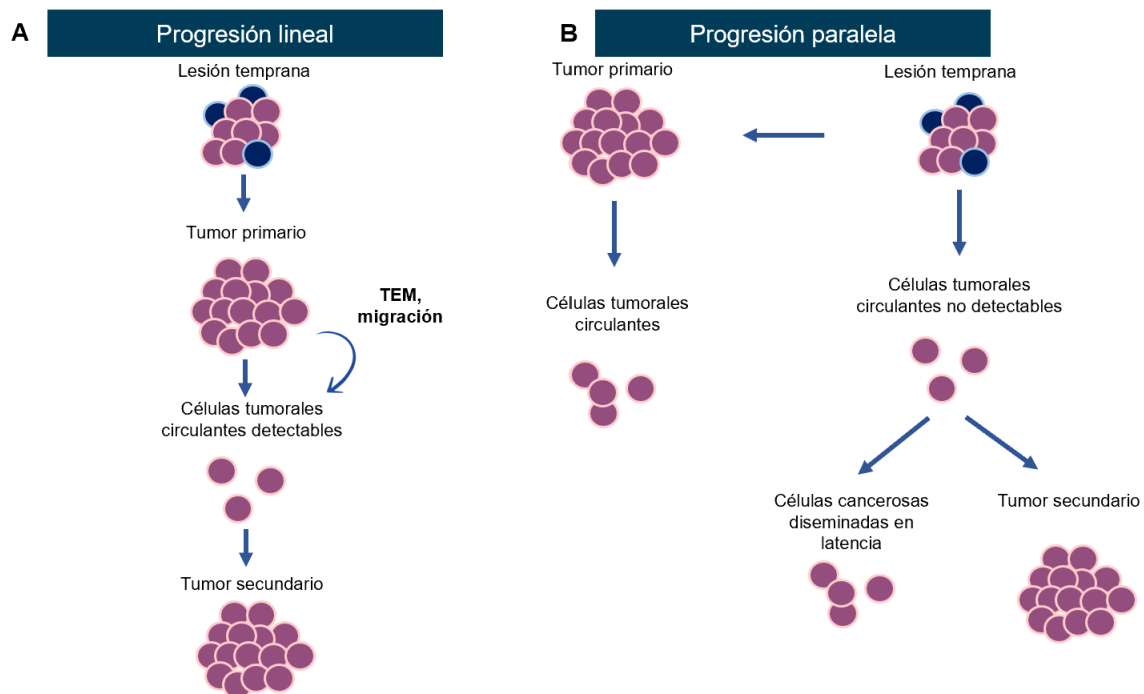


Figura 1. Modelos lineal y paralelo de la progresión del cáncer. Fuente: elaboración propia.

1.3 La transición epitelial-mesenquimal como mecanismo de progresión del cáncer

Para que se puedan llevar a cabo los dos modelos de progresión del cáncer mencionados anteriormente, se ha propuesto un mecanismo por el cual las células son capaces de adquirir todas las habilidades celulares que requieren, la Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM). En el caso de la progresión lineal, la participación de la TEM es fundamental para que las células puedan desprenderse del tumor primario y diseminarse hacia otros sitios. En el caso de la progresión paralela, se ha considerado que la TEM puede contribuir más bien a una mayor heterogeneidad de las células circulantes tumorales y desarrollar habilidades que les permita sobrevivir a las condiciones de estrés al ingresar al torrente sanguíneo.

La TEM es un programa biológico reversible, empleado normalmente por las células para el desarrollo de órganos durante la embriogénesis. En la etapa adulta, la TEM es utilizada para la reparación de tejidos que sufrieron algún daño (Lambert *et al.*, 2017). En condiciones normales, las células epiteliales presentan una fuerte cohesión célula-célula, con la finalidad de mantenerse confinadas en un mismo espacio físico y así facilitar la formación de las capas continuas de células que integran a los tejidos. Por el contrario, las células mesenquimales o células estromales multipotentes carecen de interacciones estables con otras células, permitiéndoles migrar e incluso invadir otros tejidos. Es a través de la TEM, que las células cancerosas de origen epitelial son capaces de adquirir características propias de las células mesenquimales que finalmente les permita iniciar el proceso metastásico (Kölbl *et al.*, 2016; Larue & Bellacosa, 2005; Micalizzi *et al.*, 2010).

Tradicionalmente se consideraba que la TEM implicaba la transformación directa de las células epiteliales a células de tipo mesenquimal. Sin embargo, actualmente se conoce que la transformación es gradual e incluye estadios intermedios. Las células pueden tener simultáneamente características tanto epiteliales como mesenquimales previo a tener un fenotipo completamente mesenquimal, es decir, pueden tener un fenotipo híbrido (Dongre & Weinberg, 2019; Lamouille *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2016). Este fenotipo híbrido ha mostrado

presentar ventajas para las células al momento de diseminarse, ya que debido a las características epiteliales que mantiene, pueden formar grupos, es decir, pueden mantener ciertas uniones celulares que les permite resistir la apoptosis o anoikis y garantizar ciertas propiedades pro-metastásicas e incrementar las posibilidades de encontrar un nicho metastásico (Genna *et al.*, 2020).

Los cambios que ocurren durante los estadios intermedios de la TEM se engloban en cinco aspectos: el desensamble de uniones celulares, los cambios en la polaridad, la reorganización del citoesqueleto, la adquisición de la capacidad de migración y cambios en la expresión de genes y proteínas específicos que regulan los eventos anteriores (Figura 2). El desensamble de las uniones celulares es uno de los eventos tempranos de la TEM, estas uniones permiten el establecimiento de contactos célula-célula (uniones adherentes, uniones oclusivas, desmosomas y uniones comunicantes) y contactos célula-membrana basal (hemidesmosomas).

El desensamble es consecuencia de la sustitución de las proteínas transmembranales E-cadherina e integrinas epiteliales -las cuales regulan conexiones estables célula-célula y célula-membrana basal, respectivamente- por las proteínas N-cadherina e integrinas mesenquimales, que les proporcionan uniones transitorias y dinámicas. Asimismo, en este estadio temprano de la TEM, se presenta la pérdida de dos complejos moleculares denominados PAR y SCRIB, los cuales determinan la formación del polo apical y basolateral de las células, respectivamente; la disolución de estos complejos produce la pérdida de la polaridad apico-basal característica de las células epiteliales. Es así como la pérdida de los contactos celulares estables y la pérdida de la polaridad apico-basal, permite que las células cancerosas sean capaces de desprenderse del resto de las células tumorales.

En etapas más avanzadas de la TEM, el citoesqueleto celular que estaba organizado en forma de filamentos de actina en la periferia celular (actina cortical) sufre una reorganización y se forman fibras de estrés en el cuerpo de las células y en protusiones membranales nacientes; mientras que los filamentos intermedios epiteliales conformados por citoqueratinas son reemplazados por vimentina. Entre

el citoesqueleto celular y el sustrato se forman unos complejos proteicos denominados contactos focales de adhesión, lo cuales permiten que las células tengan contacto dinámico con la matriz extracelular. Como resultado de estas modificaciones en la expresión y distribución de proteínas, las células sufren cambios morfológicos y la forma cuboidal o poligonal característica de las células epiteliales cambia a una forma elongada o de tipo fibroblastoide, representativa del fenotipo mesenquimal. Todos los cambios anteriormente mencionados permiten que las células cancerosas adquieran la capacidad de migrar e invadir la matriz extracelular, para finalmente ingresar a los vasos sanguíneos o linfáticos y diseminarse hacia otros tejidos (Kalluri & Weinberg, 2009; Lamouille *et al.*, 2014; Micalizzi *et al.*, 2010; Ye & Weinberg, 2015).

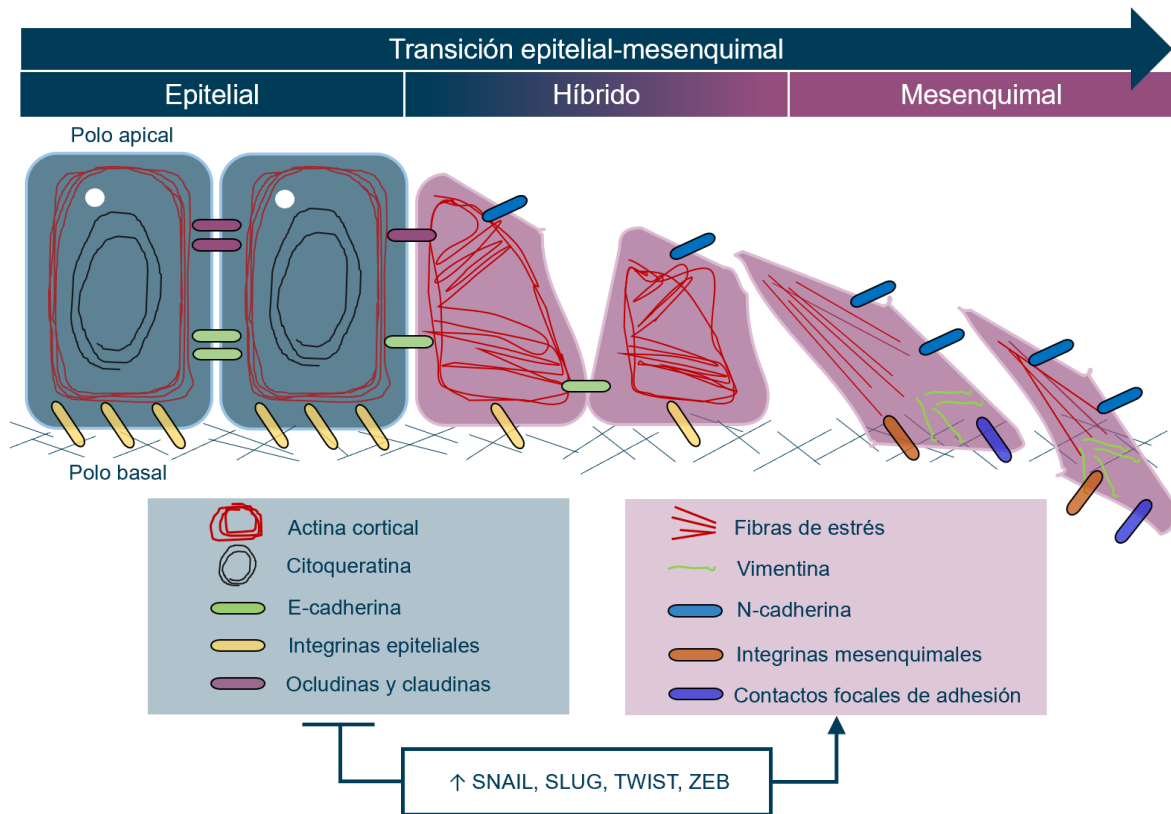


Figura 2. Cambios celulares y moleculares durante la transición epitelial-mesenquimal. Fuente: elaboración propia.

Diferentes factores de transcripción se relacionan con el inicio de la TEM, a los cuales se les denomina factores de transcripción inductores de la TEM (FT-TEM).

Los principales FT-TEM son la familia de las proteínas SNAIL (SNAIL 1 y SLUG) que actúa en conjunción con otras proteínas como el factor de crecimiento transformante β (TGF β), WNT y SMAD3 para inhibir la transcripción de genes epiteliales como claudinas, ocludinas, E-cadherina, citoqueratinas y para inducir la transcripción de fibronectina, vitronectina, N-cadherina y de otros FT-TEM como son TWIST y ZEB. Estos últimos actúan de una manera similar a SNAIL, reprimiendo la transcripción de genes epiteliales y activando genes mesenquimales (Lamouille *et al.*, 2014; Dongre y Weinberg, 2018).

La actividad de estos FT está regulada a su vez por el microambiente tumoral (MAT), esto mediante diversas moléculas solubles producidas por los distintos tipos celulares que lo componen como macrófagos, linfocitos, fibroblastos, células endoteliales, entre otros (Kölbl *et al.*, 2016). Dentro de las moléculas que se han descrito que favorecen la activación de estos FT y con ello la TEM se encuentran factores de crecimiento como el TGF- β , el epidermal (EGF), el de hepatocitos (HGF), el derivado de plaquetas (PDGF) y el de endotelio vascular (VEGF) (Lamouille *et al.*, 2014; Ye y Weinberg, 2015). Algunas hormonas también se han relacionado con la TEM de células cancerosas, como hormonas tiroideas (Weingarten *et al.*, 2018) y algunas hormonas esteroideas como estrógenos y progesterona (Jeon *et al.*, 2016).

El estudio de la TEM ha resultado de gran importancia para entender los procesos de diseminación de las células cancerosas, ya sea que contribuya a la adquisición de propiedades de migración para desprenderse del tumor primario (modelo lineal) o para garantizar la supervivencia de las células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo o linfático (modelo paralelo). Sin embargo, aún existe una gran controversia sobre el desarrollo de la TEM en modelos *in vivo* y más aún, existe un gran vacío en el conocimiento de cuáles son aquellas condiciones que favorecen la TEM en cada tipo de cáncer. Actualmente se sabe que, dependiendo la ubicación del tumor son diferentes las moléculas que pueden contribuir a la adquisición de una mayor malignidad, esto debido a los diferentes componentes del microambiente tumoral. Es por ello por lo que resulta fundamental

estudiar cada tipo de cáncer, considerando todas las características propias de cada tejido.

2. El cáncer cervical

2.1 Oncogénesis y progresión del cáncer cervical

De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), el cáncer cervical ocupa el quinto lugar de incidencia y séptimo lugar en mortalidad en la población general a nivel mundial. Específicamente en mujeres, el cáncer cervical es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en todo el mundo (Arbyn *et al.*, 2019). Este tipo de cáncer se caracteriza por aparecer en cualquiera de las regiones del cuello uterino o cérvix, el cual es un canal estrecho que conecta al útero con la vagina. El cuello uterino está revestido en su totalidad por mucosa. No obstante, dependiendo de la región, este se compone de distintos tipos celulares y poseen diferentes características.

A la porción más próxima al cuerpo del útero, se le denomina endocérvix y está constituida por células glandulares columnares. A la porción próxima a la vagina, se le denomina ectocérvix y está formado por células escamosas estratificadas. Adicionalmente, existe una zona de transición entre estos dos tipos de poblaciones celulares que se denomina unión escamocolumnar, que comparte tanto características escamosas como glandulares. Los tumores cancerosos pueden aparecer tanto en el ectocérvix, en el endocérvix, como en la unión escamocolumnar; siendo los más comunes los tumores de células escamosas (ectocérvix), seguido por los adenocarcinomas (endocérvix) y menos frecuentemente los adenoescamosos (unión escamocolumnar) (Small *et al.*, 2017).

El desarrollo del cáncer cervical se asocia con el consumo de cigarro, un estado de inmunosupresión, el uso de anticonceptivos orales, un alto número de partos y particularmente, se ha asociado con la infección por virus de papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés); e incluso se estima que el 95 % de los casos de cáncer cervical son resultado de la infección con HPV, especialmente tras

la infección con los serotipos 16 y 18. Después de la infección aguda o persistente con el HPV, se pueden desarrollar condiciones de pre-malignidad y en el transcurso de años o décadas, la displasia se puede convertir en un carcinoma *in situ*. El mecanismo que se ha sugerido que conlleva a ese estado de pre-malignidad es la expresión de dos oncoproteínas virales denominadas E6 y E7 (Figura 3).

Inicialmente, el HPV ingresa a las células basales del cérvix mediante micro abrasiones de la zona superficial del epitelio cervical. Una vez que el virus ingresa e infecta a las células hospederas, el ADN episomal viral se integra al genoma de la persona infectada para su replicación (Figura 3, núcleos morados) y se produce una sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7. Estas oncoproteínas producen la inhibición de proteínas supresoras de tumores como p53 y retinoblastoma (pRb) y con ello se evita la apoptosis de las células cervicales. La acumulación de las alteraciones en el ADN de las células epiteliales cervicales da lugar a un estado de pre-malignidad, el cual se reconoce por una lesión intraepitelial de alto grado en la región de las células escamosas. Cuando la paciente con una lesión pre-maligna no se somete a ningún tratamiento médico, es cuando puede evolucionar hasta un estado en el que las células cervicales poseen un núcleo con ADN viral integrado (Figura 3, núcleos rojos) y se presenta el crecimiento exacerbado del tumor, en el cual se inicia un proceso de micro invasión de la membrana basal que evoluciona hasta un carcinoma invasivo (Balasubramaniam *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2019)

Los cambios moleculares en el proceso de oncogénesis del cáncer cervical se ven reflejados en las características histopatológicas de la región cervical, las cuales son utilizadas por los médicos para poder identificar de manera temprana las lesiones pre-malignas o para diagnosticar los posibles casos de cánceres avanzados. La identificación de los estadios del cáncer cervical se realiza mediante el sistema de estadio clínico de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO, última actualización 2018). La evolución del cáncer cervical se divide en cuatro estadios principales según el nivel de invasión. Además, se dividen en subestadios dependiendo del tamaño del tumor y de los sitios de invasión específicos. El estadio I comprende a los carcinomas delimitados estrictamente al

cérvix. El estadio II se refiere al carcinoma que ya se extendió más allá del útero, pero que no se ha extendido más allá de un tercio de la región vaginal. El estadio III incluye a los carcinomas que han invadido el primer tercio de la vagina y se extiende hasta la pared pélvica y nódulos linfáticos circundantes. Finalmente, el estadio IV, incluye a los carcinomas que ya han invadido la región pélvica, vejiga, recto u otros órganos distantes (Lee & Atri, 2019).

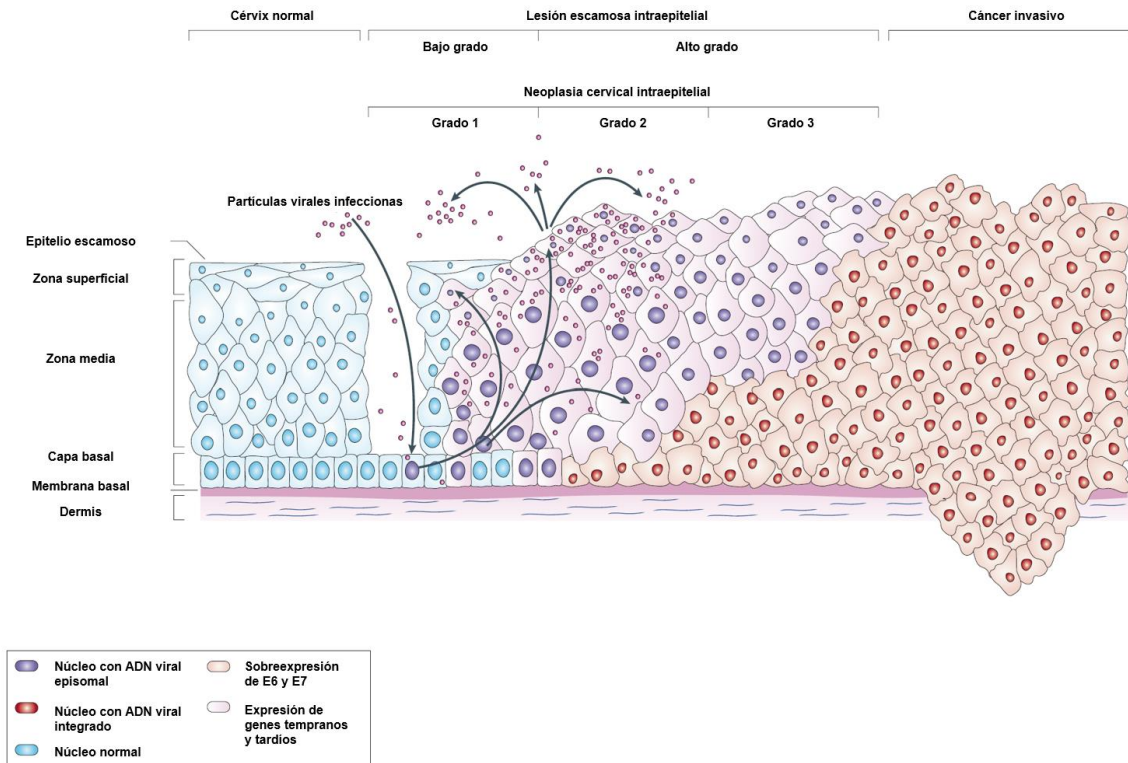


Figura 3. Progresión del cáncer cervical mediada por la infección del virus de papiloma humano. Fuente:(Woodman *et al.*, 2007).

2.2 La transición epitelial-mesenquimal en las células de cáncer cervical

La progresión del cáncer es un proceso complejo que tiene que ver con las propiedades específicas del microambiente tumoral de cada tejido. Así como en otros tipos de cánceres, el mecanismo que permite la progresión del cáncer cervical es la TEM. Y aunque se ha puesto en duda la existencia de la TEM como mecanismos de progresión en modelos *in vivo*, Ran *et al.* (2015) reportaron que en un panel de muestras de pacientes con cáncer cervical de todos los estadios reconocidos por la clasificación FIGO, las células provenientes de tejidos con los

estadios más avanzados poseen características mesenquimales, incluyendo la sobreexpresión de vimentina; a diferencia de las células provenientes de cánceres de estadios iniciales, que poseían características epiteliales, como una sobreexpresión de E-cadherina. Adicionalmente, estos autores detectaron que existe una correlación entre la expresión del factor de transcripción ZEB1 y los estadios más avanzados de la enfermedad. El factor ZEB1 está relacionado con el inicio de la TEM, como se explicó en el apartado “transición epitelio mesenquimal como mecanismo de la progresión del cáncer”.

El principal factor que se ha relacionado con la TEM del cáncer cervical es el virus de HPV. Específicamente, se ha reportado que la expresión de la oncoproteína E7 (HPV16 E7) es capaz de favorecer la TEM en células de cáncer cervical. El mismo efecto se ha reportado en queratinocitos normales expuestos a la oncoproteína E7, esto podría estar indicando que, tanto en células normales como en células cancerosas, la infección con el virus de HPV16 podría provocar la TEM. Además, en queratinocitos transformados con HPV16, las células pierden características epiteliales y adquieren rasgos mesenquimales incluso en etapas iniciales o tempranas de la transformación (Lee y Shen, 2012). Además del virus, existen otros factores del microambiente tumoral que también pueden estar participando en el inicio de la TEM del cáncer cervical. En el cuadro 1 se enlistan las moléculas que han mostrado promover la TEM de células cervicales, como el TGF- β , el EGF, la interleucina IL-6 y Jagged1, de las cuales se han podido elucidar las vías de señalización que activan y que llevan a dicha transición (Figura 4).

3. Hormona de crecimiento

3.1 Características y uso terapéutico de la hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento (GH) es una hormona peptídica sintetizada en las células somatotropas de la hipófisis anterior, desde donde es enviada a diversos tejidos como el óseo, el adiposo, el muscular y el hepático (Waters, 2016). La secreción de la GH es de manera pulsada en respuesta a dos factores hipotalámicos, la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH, por sus siglas en inglés) que estimula su secreción y la somatostatina, que la inhibe

(Vijayakumar *et al.*, 2010). Las concentraciones séricas a lo largo del día están en un rango entre 0 y 5 ng/mL y alcanzan un pico máximo de 20 ng/mL en las primeras dos horas del sueño (sueño de ondas lentas) (Brandenberger *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Moléculas de señalización involucradas en la activación o supresión de la TEM en el cáncer cervical		
Reguladores de la TEM	Categorías	Moléculas
Oncoproteínas que promueven la transformación celular	Proteínas virales del HPV	HPV16 E7
Promotores de metástasis como activadores de la TEM	Factores solubles	TGF- β EGF Jagged1 IL-6
	Sistema de transportes de iones	Contrantransportador KCl (KCC3)
	Moduladores del citoesqueleto	Rho-GTPasa RhoC Gelsolin
	Factores de transcripción	Snail Twist1 Twist2 Six1 homeoproteína Zeb1 MMPs
	Oncogenes	Sam68 AEG1 FTS
	Supresores tumorales	LMX1A Klotho
	MiRNAs	MiR-139-5p-Zeb1
	Proteínas de matriz	P4HA2
	Represores de metástasis como supresores de la TEM	Factores secretados
Factores de transcripción		LMA-1A
Fuente: para la realización de este cuadro se integró la información contenida en (Lee & Shen, 2012; Qureshi <i>et al.</i> , 2015; Ran <i>et al.</i> , 2015; Cao <i>et al.</i> , 2020; Kim <i>et al.</i> , 2020; Sun <i>et al.</i> , 2020).		

La principal función de esta hormona es la regulación del crecimiento longitudinal; además, posee efectos pleiotrópicos sobre el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas (Flores-Morales *et al.*, 2006). Cuando ingresan los alimentos al organismo, los niveles de GH se mantienen bajos y es hasta el periodo de ayuno en el que la secreción de GH es activada, disminuyendo la captación de glucosa al interior de la célula, tanto por una menor expresión de los transportadores de glucosa, como por la disminución de insulina; esto aunado a que la GH favorece la lipólisis del tejido adiposo visceral y subcutáneo lo que conlleva a la elevación de ácidos grasos libres y eventualmente la masa grasa del organismo decrece. Así mismo, algunos eventos como el ejercicio físico o la producción de hormonas

esteroides favorecen la secreción hipofisaria de GH y ésta estimula el consumo de triglicéridos en el músculo esquelético, con la finalidad de inducir la liberación de energía mediante la oxidación lipídica. En el caso del metabolismo proteico, la GH tiene efectos anabólicos, al inducir la síntesis de proteínas al mismo tiempo que reprime la proteólisis (Vijayakumar *et al.*, 2010).

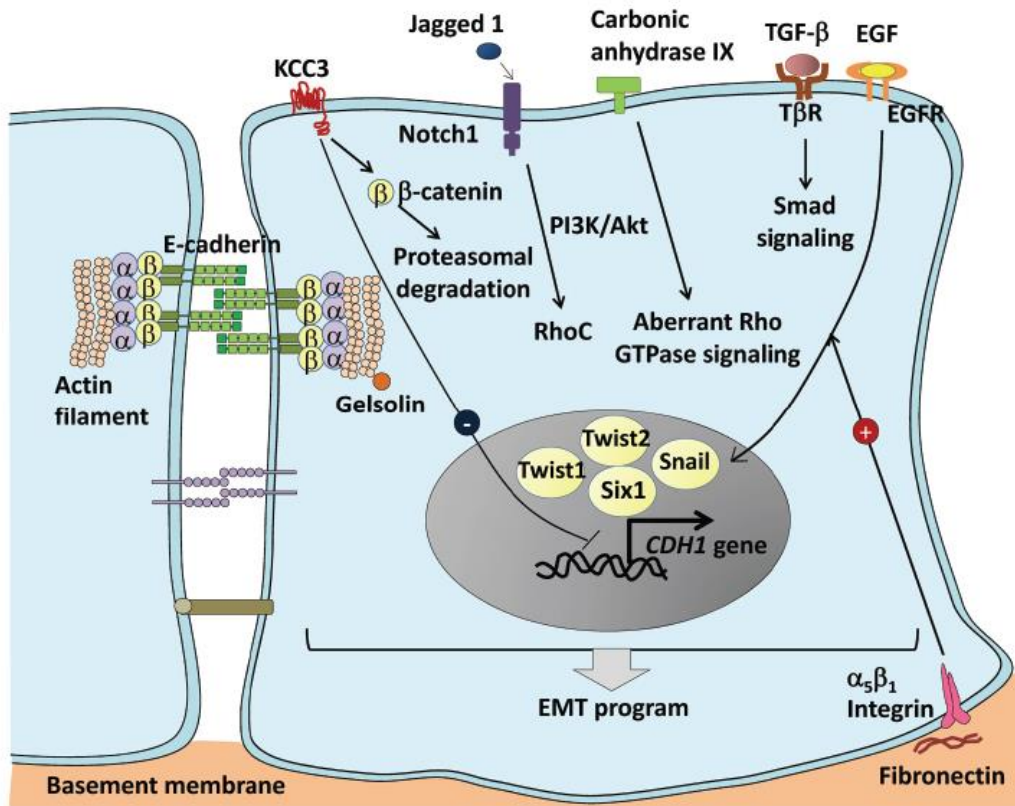


Figura 4. Vías de señalización involucradas en la TEM del cáncer cervical. Fuente: (Lee y Shen, 2012).

Como consecuencia de los diversos efectos fisiológicos de la GH, la Administración de Alimentos y Drogas de E.U.A. (FDA, por sus siglas en inglés), ha recomendado la utilización médica de la proteína recombinante de la GH en dos diferentes contextos: cuando los pacientes sufren una deficiencia en la producción hipofisaria de la GH -tanto en población infantil como adulta- y cuando no hay una deficiencia en la producción de la GH, pero beneficia el estado general del paciente. Tal es el caso de niños con diferentes síndromes que se caracterizan por talla baja como los síndromes de Noonan, de Turner, de Prader-Willie, de SHOX o baja talla idiopática

(Carroll, 1998; Spiliotis, 2008; Kemp & Frindik, 2011; Johannsson *et al.*, 2018). Asimismo, es recomendado su uso en el caso de pacientes con enfermedad renal crónica, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o en el síndrome de intestino delgado. Actualmente, se considera el uso de la GH recombinante como un coadyuvante en las Tecnologías de Reproducción Asistida (ART, por sus siglas en inglés). La GH ha mostrado mejorar la calidad de los ovocitos e incrementar la tasa de embarazos exitosos (Liu *et al.*, 2020). Sin embargo, existen otras condiciones en las que la GH es ampliamente utilizada a pesar de no estar aprobadas por la FDA, como el caso de atletas de alto rendimiento, físico-constructivistas, fibrosis quística, quemaduras cutáneas graves y como tratamiento anti-envejecimiento (Kemp y Frindik, 2011).

El tratamiento con GH se realiza a través de inyecciones subcutáneas y dependiendo de las características de los pacientes, dosis, periodo, vía de administración y estado de salud, las concentraciones séricas de la GH varían en un rango entre 0.1 y 120 ng/mL (Cuadro 2) muy por encima de las alcanzadas tras su producción hipofisiaria (0.1-20 ng/mL). A pesar de los claros beneficios fisiológicos, se ha sugerido que las altas concentraciones séricas que alcanzan los pacientes tras el tratamiento farmacológico con GH podrían relacionarse con el desarrollo de patologías cardiovasculares (Deodati *et al.*, 2014), resistencia a la insulina, diabetes (Vijayakumar *et al.*, 2010) y cáncer (Perry *et al.*, 2013).

3.2 La hormona de crecimiento y su asociación con el cáncer

La posible relación entre el tratamiento con GH y el cáncer es actualmente controversial, derivado de resultados contradictorios de investigaciones recientes. Algunos grupos de investigación reportaron que el tratamiento con GH puede incrementar la mortalidad en pacientes con cáncer colorrectal y linfoma de Hodgkin (Swerdlow *et al.*, 2002). Más adelante, en el año 2014, Deodati *et al.*, realizaron un metaanálisis para establecer el riesgo de desarrollar cáncer tras el tratamiento con GH recombinante, utilizando como base de datos todos los estudios publicados hasta el 2013. Este grupo de investigación evaluó la tasa de incidencia estandarizada (SIR, por sus siglas en inglés) y el riesgo relativo (RR), y obtuvieron

que existe una mayor tasa de incidencia de cáncer tras el tratamiento con GH (SIR 2.74), así como un mayor riesgo relativo de desarrollar una segunda neoplasia, tras iniciar el tratamiento con GH cuando se está en remisión del cáncer (RR 1.99).

Cuadro 2. Concentraciones séricas de GH después del tratamiento con GH recombinante			
Marca de GH recombinante	Vía/dosis/población	Niveles séricos de GH	Referencia bibliográfica
Norditropin®	Subcutáneo 0.0333 mg/kg/d Niños con baja talla para la edad gestacional	2.66-5.99 ng/mL después del tratamiento. 5.99-26.64 ng/mL a los seis meses.	(van Dijk <i>et al.</i> , 2006).
Norditropin®	Subcutáneo 0.067 mg/kg/d Niños con baja talla para la edad gestacional	0.66-5.99 ng/mL después del tratamiento. 12.32-35.63 ng/mL a los seis meses.	van Dijk <i>et al.</i> , 2006.
Humatrope®	Subcutáneo 0.033 mg/kg/d Adultos sanos	5-30 ng/mL a las 2-6 h.	(Keller <i>et al.</i> , 2007).
Humatrope®	Intramuscular 0.033 mg/kg/d Adultos sanos	10-60 ng/mL a las 2-6 h.	Keller <i>et al.</i> , 2007.
Norditropin®	Subcutánea 0.050 mg/kg/d Pacientes con enfermedad renal en hemodiálisis y pacientes sanos	Pacientes renales: 30-120 ng/mL a las 3-6 h. Pacientes sanos: 5-40 ng/mL a las 4-6 h.	(Langbakke <i>et al.</i> , 2007).
Jintropin®	Subcutánea 0.0286 mg/kg/d Niños deficientes de HC	10 ng/mL tras la inyección y 0.1 ng/mL a las 24 h.	(Hou <i>et al.</i> , 2015).
Genotropin®	Subcutáneo 12.9 IU Adultos sanos	40 ng/mL a la 4-7 h.	(Toffoletto <i>et al.</i> , 2016).

En ese mismo año otro estudio reportó que no hay relación alguna entre el tratamiento con GH y el desarrollo del cáncer, ni se asocia con la sobrevida de los pacientes que ya cursan con algún tipo de neoplasia (van Bunderen *et al.*, 2014). Recientemente, como resultado de esta controversia, la Sociedad Europea de Endocrinología Pediátrica (ESPE, por sus siglas en inglés) y la Sociedad Endocrina Pediátrica (PES, por sus siglas en inglés) convocaron a investigadores de todo el mundo para analizar los diferentes estudios que intentan establecer la posible relación entre el tratamiento con GH y el cáncer y concluyeron que no se tiene suficiente información para establecer una relación concreta, por lo que se requiere de mayor investigación epidemiológica por tiempos más prolongados (Allen *et al.*, 2016).

Aun cuando la relación entre el tratamiento con GH y el cáncer no está confirmada a nivel clínico, ha permanecido el interés de la comunidad científica por estudiar el posible papel de la GH sobre las células cancerosas. De manera interesante, algunos grupos de investigación han reportado que tanto la GH como su receptor (GHR) se expresan localmente en tejidos provenientes de pacientes con cáncer de mama (Gebre-Medhin *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2011), cáncer de endometrio (Wu *et al.*, 2011) y cáncer de páncreas (Subramani *et al.*, 2014). Es importante mencionar que, en estadios más avanzados del cáncer como el carcinoma invasivo, la expresión de la GH y del GHR es mayor en comparación con estadios tempranos, y más aún con la expresión basal en tejidos normales. Estos estudios sugieren que la producción local o autocrina de la GH podría estar participando en la progresión del cáncer más que con el desarrollo de éste (Perry *et al.*, 2017).

Como se mencionó al inicio, la progresión del cáncer se caracteriza por el desarrollo de metástasis a través de la TEM y en este sentido, existen estudios que relacionan la expresión autocrina de GH en las células cancerosas con la pérdida de contactos célula-célula, el incremento en la migración, cambios morfológicos y la disminución de proteínas epiteliales e incremento de proteínas mesenquimales, es decir, favorece la TEM (Cuadro 3). Sin embargo, no es claro si la administración exógena de la GH pudiese tener el mismo efecto que la producción autocrina sobre las células cancerosas debido a que se han reportado diferentes efectos dependiendo del origen de la hormona.

Algunos estudios han comparado el efecto de la GH autocrina, la cual favorece eventos relacionados con la progresión del cáncer como la proliferación y migración, en contraste con la GH exógena que no presenta tales efectos (Cuadro 4). Al parecer, esto es resultado de diferencias en la interacción de la GH y su receptor. Cuando se da la producción de GH de manera autocrina, la unión de ésta con el GHR se lleva a cabo desde el interior de la célula, específicamente en el retículo endoplásmico, lo que se considera que beneficia la maduración y transporte del GHR hacia la membrana plasmática y con ello se produce una respuesta más efectiva. En comparación con la GH exógena que se une al GHR en la membrana

plasmática y no participa en su maduración (Lea *et al.*, 2015; van den Eijnden y Strous, 2007).

Cuadro 3. Antecedentes del efecto de la expresión autocrina de GH (inducida mediante transfección) en la transición epitelial-mesenquimal de células cancerosas				
Tipo de célula	Cambios morfológicos	Incremento en la migración	Marcadores moleculares de la TEM	Referencia bibliográfica
Línea celular de cáncer de mama MCF-7	Fenotipo mesenquimal	Sí	↑vimentina ↑fibronectina 1 ↓occludinas ↓placoglobina ↔E cadherina	(Mukhina et al., 2004).
Líneas celulares de adenocarcinoma de colon DLD-1 y CaCo2	Fenotipo mesenquimal	Sí	↑fibronectina 1 (ARNm) ↑α-catenina (ARNm)	(Pandey et al., 2008).
Línea celular de cáncer de mama MCF-7	NA	Sí	↓placoglobina	(Shafiei et al., 2008).
Líneas celulares de adenocarcinoma de colon DLD-1 y CaCo2	Fenotipo mesenquimal	Sí	↑vimentina ↑fibronectina 1 ↓occludinas ↓E cadherina	(Wang et al., 2014).
Línea celular de carcinoma hepatocelular Huh7	NA	Sí	↓Claudina 1	(Chen et al., 2017).
(NA) no analizado; (↑) (↓) (↔) aumento, disminución, sin cambios, respectivamente; en la expresión de la proteína (excepto cuando se aclara que es el ARNm).				

Cuadro 4. Comparación del efecto biológico de la GH autocrina y exógena en líneas celulares de cáncer			
Tipo de célula	GH autocrina	GH exógena	Referencia bibliográfica
Línea celular de cáncer mamario MCF-7	↑↑↑ proliferación (100 pM)	↑ proliferación (100 nM)	Kaulsay <i>et al.</i> , 1999.
Línea celular de cáncer mamario MCF-7 y endotelial HMEC-1	↑ proliferación ↑ migración e invasión	↔ proliferación (100 nM) ↔ migración e invasión (100 nM)	(Brunet-Dunand et al., 2009).
Línea celular de cáncer prostático LNCaP	↑ apoptosis	↑ proliferación (10 ng/mL)	(Nakonechnaya et al., 2013)
(↑) (↓) (↔) aumento, disminución, sin cambios, respectivamente.			

En resumen, la GH ha mostrado favorecer la TEM de algunos tipos de cánceres como melanoma, mama, hepatocelular y colon, pero solo cuando esta se expresa de manera autocrina. Y considerando los efectos diferenciales según el origen de la GH, se requiere desarrollar mayor investigación sobre si la GH exógena, como producto del uso de terapia de reemplazo o niveles elevados de GH en sangre, pueden favorecer también la TEM de estos tipos cancerosos. No es claro, además, si la GH exógena es capaz de regular la TEM de células de cáncer cervical ni si puede regular la TEM en células con características similares a las lesiones precancerosas, como ocurre en las primeras fases de la progresión paralela o si lo hace solo en aquellas células que ya poseen características cancerosas y que pertenecen a un tumor primario, como ocurre en el modelo de progresión lineal.

3.3 La hormona de crecimiento y su relación con cáncer cervical

La GH se ha relacionado con la progresión y la TEM de células de cáncer endometrial, de mama, de melanoma, hepatocelular y de colon. Sin embargo, no se ha probado el posible rol que la GH pudiese tener en células de cáncer cervical a pesar de que existe evidencia que la relaciona con la progresión del cáncer cervical. En un estudio realizado por Dehari *et al.* (2008), encontraron que la expresión nuclear del GHR está incrementada en células de cáncer cervical proveniente de mujeres de menos de 40 años de edad. En contraste, el porcentaje de expresión del GHR tanto de células estromales como de células cancerosas, provenientes tanto de mujeres menores de 40 años, como mayores de esa edad, mostraron altos niveles de expresión de GHR citoplasmático. En este mismo estudio se discute que, si bien los niveles de GHR citoplasmático son elevados tanto en células normales como en células cancerosas, los niveles de GHR nuclear son más evidentes en las células cancerosas, lo cual se ha relacionado con una mayor tasa de proliferación en estas células.

4. Modelo de estudio

4.1 La línea celular de cáncer cervical HeLa

Para conocer si la aplicación exógena de la GH puede favorecer la TEM de las células de cáncer cervical, en el presente trabajo, se utilizó a la línea celular HeLa

como modelo de estudio. La línea celular HeLa fue desarrollada en la década de 1950 y proviene de una lesión agresiva de adenocarcinoma cervical, diagnosticado en una mujer afroamericana de 30 años. Existe evidencia que sugiere que el cáncer se desarrolló a partir de una infección por el virus de HPV18. Al ser la primera línea celular establecida en un laboratorio, es la línea más empleada para la investigación en biología celular y específicamente, en cáncer (Landry *et al.*, 2013). Para el desarrollo de esta línea celular, la muestra fue tomada de un adenocarcinoma primario, por lo que el uso de esta línea celular es un modelo adecuado para poder estudiar la TEM. Sin embargo, a pesar de ser una línea celular ampliamente utilizada, no se tiene información sobre la etapa específica o estadio de la enfermedad en la que se encontraba la paciente.

4.2 La línea celular de epitelio normal embrionario HEK293

Para conocer si la aplicación de la GH puede favorecer la TEM de células normales, se utilizó a la línea celular HEK293 como modelo de estudio. Estas células corresponden a un fenotipo epitelial normal y se derivan de riñón de embrión humano. Debido a su origen embrionario, esta línea celular representa un buen modelo para el estudio de la TEM ya que incluso se ha demostrado que, bajo ciertas condiciones, son capaces de realizar dicha transición (Fischer *et al.*, 2017).

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades oncológicas forman parte de las principales causas de mortalidad dentro de las enfermedades no transmisibles a nivel mundial (OMS, 2014) y representan la tercera causa de muerte en México (INEGI, 2014). El cáncer cervical representa la tercera causa de muerte en mujeres en todo el mundo y el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres. Aunque el cáncer cervical no es el tipo de cáncer más frecuente, suele tener una tasa de supervivencia menor que otros tipos de cánceres. Aproximadamente la tasa de supervivencia a 5 años después del diagnóstico es del 66 %, eso siempre y cuando el diagnóstico se realice en una fase temprana. Y se estima que solo el 44 % de los casos se diagnostica oportunamente (GLOBOCAN, 2020).

Un aspecto importante para destacar es que la causa de muerte más frecuente de los pacientes que padecen cáncer -y el principal reto en la práctica clínica-, es el desarrollo de metástasis. Aproximadamente el 90 % de muertes ocurre durante esta fase y como consecuencia de alguna complicación de este proceso (Lambert *et al.*, 2017). La metástasis es un fenómeno complejo que se relaciona con etapas terminales del cáncer y si bien es la más evidente en el paciente, este proceso inicia desde etapas tempranas, a través de la TEM. Al ser la TEM un fenómeno reversible, esta puede ocurrir en múltiples ocasiones a lo largo de la enfermedad. Pero, en qué momento ocurre y por qué ocurre, son preguntas relevantes, cuya solución podría favorecer el desarrollo de terapias más adecuadas. La GH se ha relacionado con la regulación de la TEM y la metástasis; sin embargo, no es claro si la GH es capaz de favorecer la TEM de las células de cáncer cervical.

Diversas áreas de la medicina utilizan el tratamiento con GH para diferentes enfermedades, así como coadyuvante de los tratamientos de reproducción asistida y pérdida de peso en atletas por lo que la relevancia del presente estudio radica en la generación de conocimiento sobre las posibles afectaciones del uso de esta hormona en pacientes con neoplasia cervical.

HIPÓTESIS

La aplicación exógena de la GH favorece la transición epitelio-mesenquimal de las células de cáncer cervical, HeLa.

La aplicación exógena de la GH no favorece la transición epitelio-mesenquimal de células normales HEK293.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la GH en la transición epitelio-mesenquimal de las células de cáncer cervical HeLa y de las células epiteliales normales HEK293.

Objetivos específicos

- Conocer los niveles de expresión del GHR de las células de cáncer cervical HeLa y de las células epiteliales normales HEK293.
- Analizar el efecto de la aplicación de GH en la dispersión de las células de cáncer cervical HeLa y de las células epiteliales normales HEK293.
- Evaluar el efecto de la aplicación de GH en la migración de las células de cáncer cervical HeLa y de las células epiteliales normales HEK293.
- Estudiar el efecto de la aplicación de GH en las características morfológicas y organización del citoesqueleto de actina de las células de cáncer cervical HeLa y de las células epiteliales normales HEK293.
- Evaluar el efecto de la aplicación de GH en la expresión de las proteínas E-cadherina y vimentina, utilizadas como marcadores de la transición epitelial-mesenquimal de las células de cáncer cervical HeLa y de las células epiteliales normales HEK293.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

La línea de células embrionarias epiteliales de riñón HEK293 y la línea de células cáncer cervical HeLa proporcionadas por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y autenticadas (STRP, short tandem repeat profiling) por en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Los cultivos fueron mantenidos en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) completo, es decir, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 8 % utilizando como antibióticos penicilina/estreptomicina (P/E) al 1 %, incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂ en un ambiente humidificado. En todos los ensayos, las células se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 bajo en suero (MBS), suplementado con 1 % de SFB y 1 % de P/E. El medio MBS fue utilizado para disminuir el potencial efecto GH de cualquier otro factor presente en el suero. La concentración de 1 % de SFB es suficiente para mantener la viabilidad y potencial proliferativo de los cultivos celulares (datos no mostrados).

Uso de EGF como control positivo

El papel del EGF en el desarrollo y progresión del cáncer ha sido ampliamente estudiado. Específicamente, se conoce que este factor es capaz de favorecer la TEM de células de cáncer mamario (Kim *et al.*, 2014), cervical (Lee *et al.*, 2008) y prostático (Gan *et al.*, 2010) a una concentración de 10 ng/mL. Por esta razón, en este estudio se utilizó el EGF como control positivo a la concentración mencionada anteriormente.

Tratamiento con HC

En el presente estudio, los experimentos se realizaron con GH recombinante (Humatrope® Eli Lilly, USA) preparada siguiendo las indicaciones del fabricante. Las concentraciones iniciales se seleccionaron considerando las concentraciones que alcanza la GH en la circulación sanguínea de los pacientes bajo tratamiento con

GH (Cuadro 1); además, se agregó una concentración que supera los niveles fisiológicos: 10, 100 y 1000 ng/mL. A partir de la realización de experimentos piloto, se seleccionó la concentración de 100 ng/mL de GH para el resto de los experimentos.

Ensayo de dispersión celular

Las células cancerosas adquieren la habilidad de separarse entre sí al inicio de la TEM. Para el análisis del efecto de la GH sobre la pérdida de los contactos intercelulares se utilizó el ensayo de dispersión. Este ensayo consiste en permitir la formación de colonias compactas (grupos de células provenientes de una única célula) y observar la pérdida de las uniones oclusivas y adherentes que da lugar a la dispersión de las colonias (Fram *et al.*, 2011) como resultado de un estímulo externo. Las densidades de sembrado y los tiempos de incubación se estandarizaron previo a la realización de los experimentos con GH (datos no mostrados).

Las líneas celulares HEK293 y HeLa se sembraron a una densidad celular de 1,050 cel/cm² en medio completo e incubadas durante 48 (HeLa) o 72 h (HEK293) para permitir la formación de colonias compactas y aisladas. Después de transcurrido ese tiempo, las células se incubaron con MBS durante 24 h. A continuación, se incubaron con 10 µg/mL de mitomicina C (Sigma-Aldrich) por 2 horas, para inhibir la proliferación de las células (Di *et al.*, 2015). Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS, y a continuación, se agregó medio MBS, conteniendo GH (100 ng/mL) o EGF (10 ng/mL). Como control se utilizó medio MBS sin GH ni EGF. Después de 0, 24 y 48 h se seleccionaron y fotografiaron 30 campos por condición (tres experimentos independientes), a través de un microscopio de contraste de fases con un objetivo 4x (Nikon Eclipse TS100). Para la cuantificación de la dispersión celular, las colonias de cada campo fotografiado se clasificaron en dispersas y no dispersas y el resultado se expresó como porcentaje. Una colonia se clasificó como dispersa cuando alrededor de la mitad de células de la colonia habían perdido contacto con las células circundantes o cuando exhibieron una morfología de tipo fibroblastoide (Fram *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2012).

Ensayo de reparación de la monocapa

Además de adquirir la capacidad de dispersarse, durante la TEM, las células cancerosas adquieren la capacidad de migrar. Para conocer si la GH puede ser un factor que favorezca la migración celular se utilizó el ensayo de reparación de la monocapa. Este ensayo consiste en permitir la formación de una capa celular homogénea (monocapa) a la que se le realiza un raspado que produce un espacio libre de células (herida) que, eventualmente es cubierto por las células que hayan sido capaces de migrar desde el borde de la herida. Las condiciones del ensayo, tales como densidades de sembrado y tiempos de incubación se estandarizaron previo a la realización de los experimentos con GH (datos no mostrados).

Inicialmente, para este ensayo se sembraron las células en multiplatos de 24 pozos recubiertos con poli-L-lisina [500 µg/mL], a una densidad celular de 3.1×10^4 cel/cm² para células HEK293 y de 2×10^4 cel/cm² para las células HeLa en medio completo. Después de 48 (HEK293) y 72 h (HeLa) del sembrado, las células fueron incubadas en medio MBS por 24 h hasta la formación de la monocapa. Posteriormente, las células fueron incubadas con mitomicina C (10 µg/mL) durante 2 h para inhibir la proliferación y subsecuentemente, se realizó la herida de la monocapa utilizando una punta de micropipeta de 200 µL. Las células residuales se desprendieron mediante dos lavados con PBS y se agregó medio MBS sin GH, con GH (100 ng/mL) o con EGF (10 ng/mL).

Las micrografías se tomaron de una región central de cada herida a las 0, 24 y 48 h bajo un microscopio de contraste de fases con un objetivo 4x. Las micrografías se analizaron mediante el software ImageJ con la herramienta *wound healing tool* (v. 1.51j8). La tasa de migración fue calculada como se describió anteriormente (Sridaran *et al.*, 2016). Brevemente, con el dato obtenido con la herramienta *wound healing tool*, se calculó la tasa de migración restando del área total de la imagen el área de la herida y a esto se le denominó área de migración. El área de migración del tiempo 24 y 48 se dividió entre el área de migración del tiempo 0 para obtener la tasa de migración de las 24 y 48 h, respectivamente.

Análisis de morfología y citoesqueleto celular mediante tinción con faloidina

Durante la TEM, las células presentan cambios en la morfología, la cual a su vez está determinada por modificaciones en la organización del citoesqueleto de actina (Lyons *et al.*, 2016). Para conocer si la aplicación de la GH puede favorecer cambios en la morfología y organización del citoesqueleto de actina de las células de cáncer cervical, se utilizó el ensayo de dispersión celular, mismo que se describió en el apartado anterior, excepto que las células se sembraron sobre cubreobjetos. Al finalizar ese ensayo, las células fueron teñidas con faloidina, una micotoxina que se une y estabiliza los filamentos de actina de las células y que, mediante el fluorocromo al cual está unida (Alexa Fluor® 594) se puede visualizar el citoesqueleto celular utilizando microscopía de fluorescencia.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, a las 0, 24 y 48 h las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 20 min. A continuación, las células fueron incubadas con faloidina conjugada con Alexa Fluor 594® (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) diluido en PBS (1:100) con 0.1 % de Triton X-100 Sigma-Aldrich) y con Hoechst (Invitrogen) para la visualización de los núcleos celulares por 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos para su visualización. Las observaciones se realizaron mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 400. Las micrografías se tomaron de 10 campos aleatorios usando un objetivo de 10x, de dos experimentos independientes.

El análisis de la morfología y organización del citoesqueleto de actina se realizó bajo dos enfoques, el cualitativo y el cuantitativo. Para el análisis cualitativo se consideraron las características morfológicas típicas de las células durante la TEM, como la morfología poligonal, elongada, también llamado de tipo fibroblastoide y morfología circular, de acuerdo con (von Laue *et al.*, 2000). Asimismo, también se analizaron las protuberancias de la membrana tales como lamellipodia, pseudopodia y filopodia. Finalmente, se realizó un análisis morfológico cuantitativo midiendo algunos parámetros morfológicos como el área, la circularidad, la relación de aspecto y la redondez, utilizando el software ImageJ.

Para el análisis cuantitativo, todas las micrografías se convirtieron a 8 bits y se procesaron con el filtro de máscara de enfoque (radio sigma 1,5 px y peso de máscara 0,60) para mejorar la visualización de los filamentos de actina.

Análisis de la expresión del GHR y de las proteínas E-cadherina y vimentina mediante citometría de flujo

Para el análisis de la expresión del receptor de la GH (GHR) los cultivos (cajas petri de 100 mm) de las líneas celulares HEK293 y HeLa se transfirieron hasta el quinto pasaje después de la descongelación. Las células (1×10^6) se lavaron con suero de albúmina bovina en PBS (PBA) al 1 % y se incubaron con Triton X-100 al 0,1 % (Sigma-Aldrich) durante 15 min. Finalmente, las células se tiñeron con anticuerpo anti-GHR (B10) Alexa Fluor® 647 (Biotecnología de Santa Cruz; Dallas, TX, EE. UU.) y se fijaron con formaldehído (FA) al 4 %.

Los eventos celulares de dispersión, migración y cambios morfológicos son resultado de cambios en las células a nivel molecular que conllevan a la TEM, específicamente la disminución de proteínas epiteliales como e-cadherina y el incremento de proteínas mesenquimales como vimentina. Para conocer si la GH puede favorecer la TEM, se evaluó la expresión de las proteínas e-cadherina y vimentina, mediante citometría de flujo. Inicialmente, las células HEK293 y HeLa se sembraron a 5×10^3 células/cm² (HEK293) o $2,5 \times 10^3$ células/cm² (HeLa) en condiciones de control con medio MBS, tratamiento con GH (100 ng/mL en medio MBS) o EGF (10 ng/mL en medio MBS).

A las 12 y 24 h, las células se tripsinizaron y se incubaron con anticuerpo anti-E-cadherina PE-Cy®7 (Biolegend; San Diego, CA, EE. UU.) durante 30 min. A continuación, las células se lavaron con PBA al 1 % y se fijaron con formaldehído al 4 % durante 15 min. Posteriormente, las células se incubaron con Triton X-100 al 0,1 % (Sigma-Aldrich) durante 15 min. Después de la permeabilización, las células se incubaron durante 45 min con el anticuerpo anti-vimentina-PE (Becton-Dickinson; San José, CA, EE. UU.) y se fijaron con formaldehído al 4 %. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo BD LRS Fortessa™ (Becton-Dickinson) y se

analizaron con el software FlowJo® (FlowJo, Tree Star; Ashland, OR, EE. UU.). Para este análisis se llevaron a cabo dos experimentos independientes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis y gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism® versión 6 para Windows (software GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.). Antes del análisis estadístico, todos los datos fueron sometidos a las pruebas de Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov para evaluar si los datos cumplían con el supuesto de normalidad. Para los ensayos de dispersión y reparación de la herida, los datos se representan como las medias \pm errores estándar de la media (E.E.M.) de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de medidas repetidas; cuando se encontraron diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba post hoc de Holm-Sidak. Para el análisis de morfología y citoesqueleto de actina, las medidas de todas las células de 10 campos de dos experimentos independientes se representan en diagramas de caja (rango de celdas 45-125) y se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo para todos los análisis.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Las células de cáncer cervical HeLa y las células epiteliales embrionarias HEK293 expresan al receptor de GH, pero solo la GH promueve la dispersión de células HeLa

La expresión del GHR fue analizada en las células HeLa y HEK293 para conocer si estas líneas celulares son responsivas al tratamiento con GH. Existen algunos reportes que señalan que el GHR se expresa en las células HEK293 (von Laue *et al.*, 2000); sin embargo, existe muy poca información sobre la expresión del GHR en las células HeLa. Los resultados de este estudio muestran que ambas líneas celulares tienen una elevada expresión de la proteína de GHR, desde el descongelamiento de las células (Figura 5A, T1) hasta el quinto pasaje (Figura 5A, T2-T5).

A continuación, se evaluó la dispersión celular, uno de los eventos celulares tempranos de la TEM. Inicialmente, se realizó un experimento piloto para seleccionar la concentración de GH ideal para llevar a cabo los experimentos. Para ello se probaron diferentes concentraciones fisiológicas (1, 10, 100 ng/mL) y una concentración suprafisiológica (1000 ng/mL). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta prueba piloto (Anexo 1), se seleccionó la concentración de 100 ng/mL para los experimentos subsecuentes. En condiciones basales, las células HeLa forman colonias no compactas, con las células distinguibles (Figura 5D, paneles superiores) presentando una dispersión celular del 5.76 ± 0.55 % a las 24 h y de 37.31 ± 0.97 % a las 48 h (Figura 5B).

Contrariamente, las células HEK293 crecen en colonias compactas bajo condiciones basales (Figura 5E, paneles superiores), con un porcentaje de dispersión celular de 6.75 ± 0.88 % a las 24 h y de 14.38 ± 1.14 % a las 48 h (Figura 5C). En contraste, aunque ambas líneas celulares expresan el GHR, solo las células cancerosas HeLa fueron sensibles al efecto de dispersión de la GH. Por otra parte,

las células HeLa presentaron, 48 h después de iniciada la exposición con GH, un porcentaje de dispersión de $59.4 \pm 2.02 \%$, es decir, 22 % más respecto a las condiciones control ($p < 0.001$, Figura 5B), Como se esperaba, el EGF incrementó la dispersión de las células HeLa desde las 24 h ($38.91 \pm 8.58 \%$, $p < 0.0001$) siendo más evidente a las 48 h ($88.64 \pm 3.99 \%$, $p < 0.0001$). Similar a lo ocurrido con GH, el EGF no afectó la dispersión de las células HEK293.

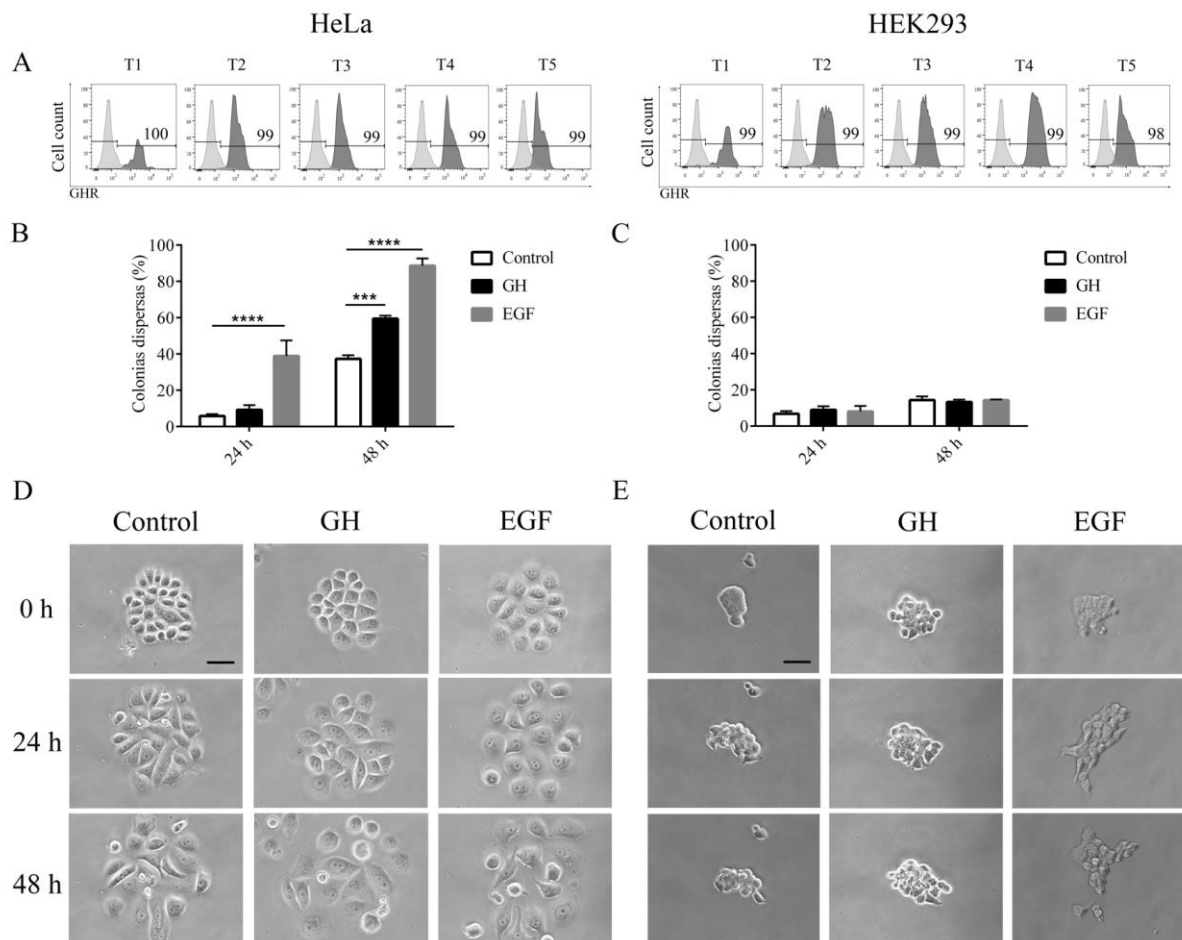


Figura 5. Tanto la línea celular HEK293 como HeLa expresaron la proteína GHR durante la transferencia de subcultivos. Sin embargo, la GH solo promueve la dispersión de células HeLa. (A) Las líneas celulares HEK293 y HeLa (T1-T5) se tiñeron con anticuerpo anti-GHR Alexa Fluor 647 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas de color gris claro representan el control de isotipo. Los histogramas de color gris oscuro representan la expresión de la proteína GHR. Los números dentro de los recuadros representan el porcentaje de células que expresan la proteína GHR. (B, D) Las células HeLa y (C, E) HEK293 fueron incubadas hasta formar colonias compactas. Después de 48 (HeLa) o 72 h (HEK293) de sembradas, las colonias se trataron con mitomicina C (10 µg/mL) durante 2 h y se incubaron con o sin GH (0, 100 ng/mL) o EGF (10 ng/mL). Las colonias seleccionadas aleatoriamente en cada condición fueron fotografiadas a las 0, 24 y 48 h y clasificadas en dispersas y no dispersas (un total de 30 campos obtenidos de tres experimentos independientes n=3). Las micrografías son colonias representativas (objetivo con magnificación 20X). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001. Barra de escala 50 µm.

La GH incrementa la migración de las células HeLa, pero no afecta a las células HEK293

Una característica central de las células cancerosas durante la TEM es la adquisición de la capacidad migratoria. Para evaluar si la GH es capaz de incrementar la migración de las células cancerosas y no cancerosas, se llevó a cabo el ensayo de reparación de la monocapa. Inicialmente, se realizó un experimento piloto para determinar la concentración óptima de GH que estimula la migración celular. Para ello se probaron diferentes concentraciones fisiológicas (1, 10, 100 ng/mL) y una concentración supra fisiológica (1000 ng/mL). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta prueba piloto (Anexo 2), se determinó que la concentración óptima para evaluar el efecto de la hormona es de 100 ng/mL en los experimentos subsecuentes.

En condiciones basales, las células cancerosas HeLa tienen una alta tasa de migración (1.153 ± 0.02 a las 24 h y 1.294 ± 0.02 a las 48 h) (Figura 6C). En contraste, las células HEK293 presentan una baja tasa de migración en condiciones basales (1.094 ± 0.02 a las 24 h y 1.095 ± 0.02 a las 48 h) (Figura 6D). Después de 48 h de incubación, la GH favoreció la tasa de migración de las células HeLa a 1.316 ± 0.04 , $p < 0.05$, pero no afectó a las células HEK293 (Figura 6A, B). De manera similar, el EGF potenció la migración de las células HeLa (24 h: 1.263 ± 0.03 , $p < 0.05$; 48 h: 1.361 ± 0.01 , $p < 0.01$), pero no afectó a las células HEK293. Considerando los resultados obtenidos en los ensayos de dispersión y migración celular, se sugiere que la GH puede favorecer la dispersión y migración de las

células cancerosas HeLa, pero no produce ningún cambio en las células no cancerosas HEK293.

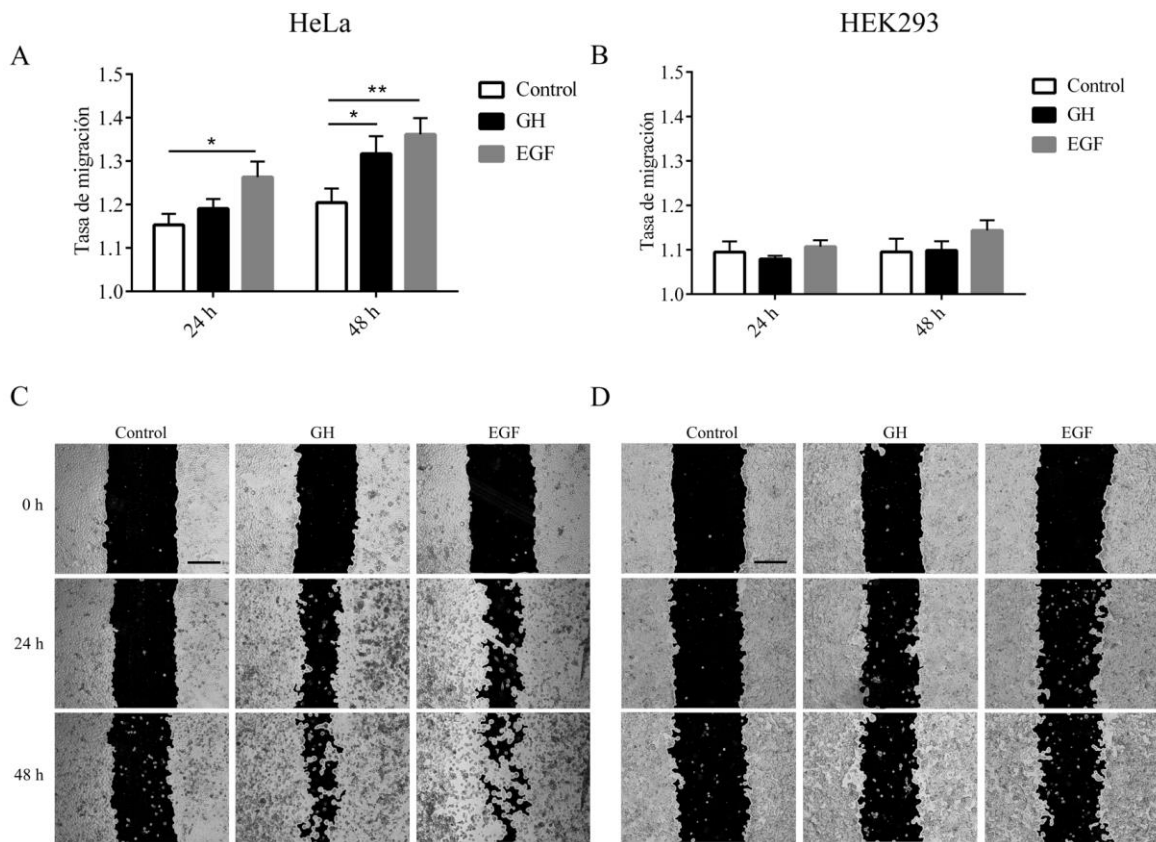


Figura 6. La hormona del crecimiento potencia migración de las células cancerosas HeLa, pero no de las , HEK293. Inicialmente, se permitió que las células (A, C) HeLa y (B, D) HEK293 formaran una monocapa, y se hizo una herida lineal en cada monocapa usando una punta de micropipeta de 200 μ L. Después del tratamiento con mitomicina C (10 μ g/mL durante 2 h), las células se incubaron con o sin GH (0, 100 ng/mL) o EGF (10 ng/mL). Las heridas seleccionadas al azar en cada condición se fotografiaron a las 0, 24 y 48 h (un total de 9 campos o heridas de tres experimentos independientes n = 3). La tasa de migración se midió usando el software ImageJ como se indica en el apartado de métodos. Las micrografías son heridas representativas de cada condición (objetivo con magnificación 4X). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001. Barra de escala 300 μ m.

La GH incrementa el área celular y promueven la formación de protusiones membranales en las células cancerosas HeLa y en las no cancerosas HEK293

Los eventos celulares de dispersión y migración están regulados por la reorganización del citoesqueleto de actina, el cual produce cambios en la morfología celular. A través de la tinción de faloidina se lograron visualizar los filamentos de actina y se realizó un análisis morfológico cualitativo y cuantitativo para determinar

si la GH afecta la estructura de las células cancerosas y no cancerosas. En condiciones basales, a las 24 h, las células HeLa tienen una morfología poligonal y presentan algunos microfilamentos. A las 48 h, las células presentan la misma morfología y se observan otro tipo de proyecciones membranales además de las observadas a las 24 h. Sin embargo, sí se observa un incremento en el área de las células cuando las células son incubadas con GH. El incremento en el área de las células HeLa es evidente desde las 24 h, y aunque algunas células mantienen una morfología poligonal, tal como se observa en las células control, otras células adquieren una morfología polarizada, característica de un estado migratorio convencional. A las 48 h, se observó un gran número de microfilamentos distribuidos en la periferia de las células (Figura 7A, cabezas de flechas).

En el caso del EGF, este produce efectos más evidentes en la morfología de las células HeLa. Tal como se esperaba, este factor de crecimiento induce una morfología de tipo fibroblastoide en las células HeLa desde las 24 h de incubación (Figura 7A, flechas); aunque algunas células permanecen con una morfología redondeada. Por otro lado, tanto a las 24 como a las 48 h, las células no cancerosas HEK293 mostraron una morfología ligeramente alargada en condiciones basales, característica de esta línea celular, y no presentaron ninguna protrusión membranal. Cuando las células HEK293 fueron estimuladas con GH, desde las 24 h de incubación estas presentaron un incremento de área y una morfología poligonal, acompañado de la formación de múltiples lamelipodios en la periferia celular, los cuales permanecieron hasta las 48 h (Figura 7B, cabezas de flechas). Aunque no se observó una morfología polarizada, el incremento en las protrusiones membranales fue evidente.

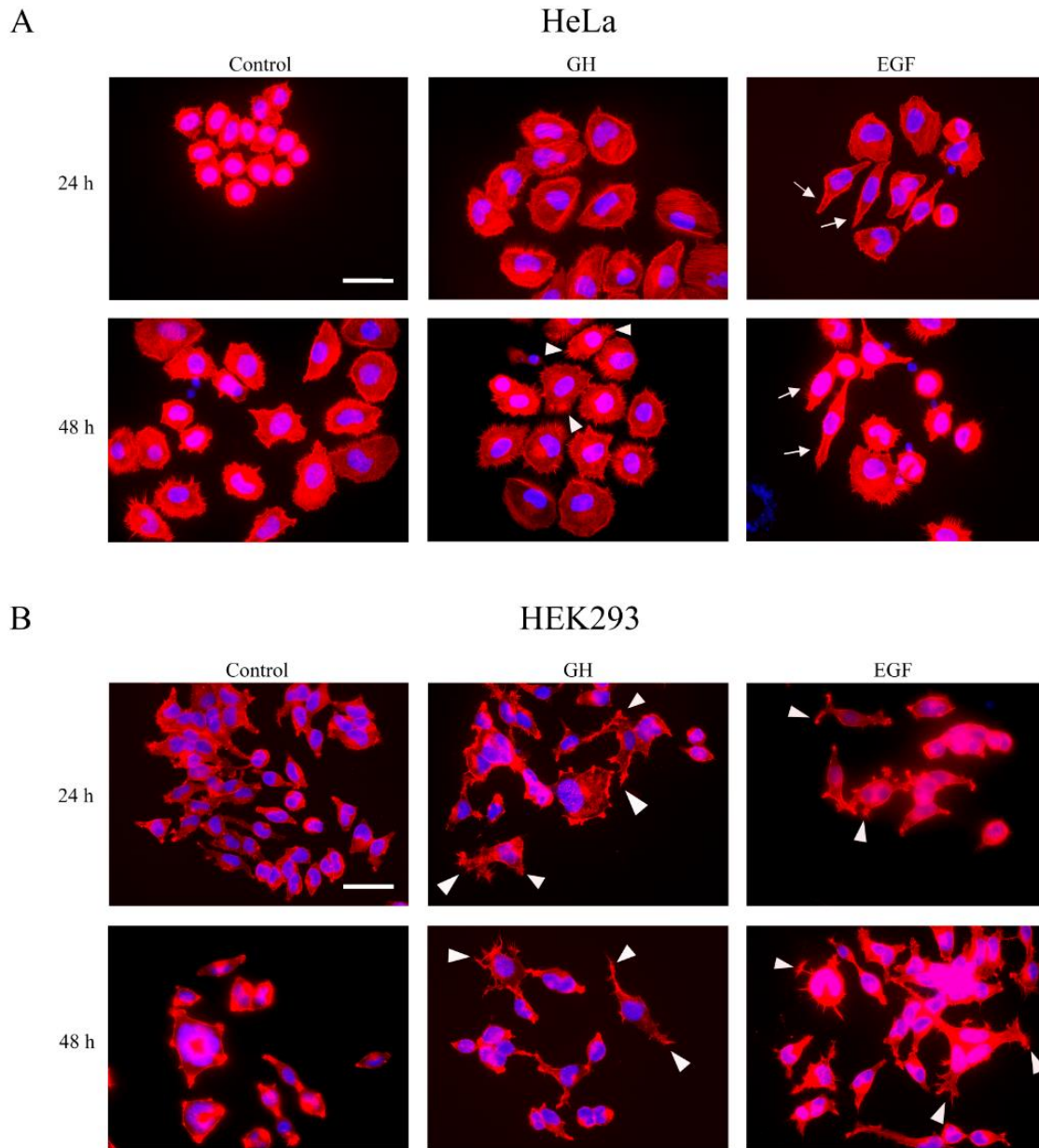


Figura 7. La GH promueve la formación de protrusiones membranales tanto en células HEK293 como en HeLa. (A) Las células HeLa y (B) HEK293 se sembraron sobre cubreobjetos y se incubaron hasta la formación de colonias. Después del tratamiento con mitomicina C (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 2 h), las células se incubaron con o sin GH (0, 100 ng/mL) o EGF (10 ng/mL) durante 24 o 48 h. En los puntos finales, las células se fijaron con PFA al 4 % y se tiñeron con faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 y Hoechst para la visualización de los filamentos de actina y el núcleo, respectivamente. Las flechas de cabeza en el panel A y B indican la formación de filopodios y microfilamentos. Las flechas indican células con morfología similar a fibroblastos. Las micrografías muestran colonias representativas (objetivo con magnificación 40X). Barra de escala 50 μm .

Todas estas observaciones pueden ser trasladadas a un enfoque cuantitativo mediante la medición de diferentes parámetros morfológicos como área, circularidad, relación de aspecto y redondez. A las 24 h, la GH produjo un incremento en el área y en la relación de aspecto de las células cancerosas HeLa (Figura 8A, $p < 0.0001$; Figura 4C, $p = 0.04$, respectivamente) y una disminución en la redondez (Figura 8D, $p = 0.04$). Después de 48 h de incubación, la GH disminuyó la circularidad de estas células (Figura 8B, $p = 0.0004$). En las células no cancerosas HEK293, la GH tuvo efectos similares que en las células HeLa. A las 24 h de incubación con la GH, las células HEK293 incrementaron su área y relación de aspecto (Figura 8E, $p = 0.005$; Figura 4G, $p = 0.02$, respectivamente) y disminuyeron su redondez (Figura 8H, $p = 0.018$), y fue hasta las 48 h que la GH favoreció una disminución de la circularidad de las células HEK293 (Figura 8F, $p = 0.001$).

En el caso del EGF, a las 24 h se produjo un aumento del área y una disminución de la circularidad de las células HeLa ($p < 0.0001$ y $p < 0.001$, respectivamente. Figura 8B), pero después de 48 h de incubación, el área celular disminuyó dramáticamente (Figura 8A, $p < 0.001$). A pesar de que se observa una tendencia a incrementar la relación de aspecto inducida por el EGF, solo a las 24 h se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 8C, $p = 0.002$). Esto puede deberse a que algunas células permanecen con una morfología redondeada. En comparación con la GH, el EGF incrementó el área de las células HEK293 después de las 24 y 48 h de exposición (Figura 8E, $p = 0.04$ y $p = 0.0002$, respectivamente) y disminuyó la circularidad hasta las 48 h (Figura 8F, $p < 0.0001$).

En resumen, la GH no produjo una morfología elongada en las células HeLa, pero favoreció la formación de protrusiones membranales como microfilamentos. Estos resultados se pueden correlacionar con los obtenidos en el análisis cuantitativo, en donde se observó que la GH disminuyó la circularidad y redondez de las células HeLa, lo que coincide con la formación de microfilamentos en estas células. Asimismo, el ligero incremento de la relación de aspecto de las células HeLa se puede relacionar con la morfología elongada de las células. Y claramente el incremento en el área de las células refleja el incremento en el tamaño de las

mismas bajo la estimulación con GH. Por otro lado, las modificaciones cualitativas de las células no cancerosas HEK293 provocadas por la GH, también se pueden correlacionar con los parámetros morfológicos medidos. La GH favoreció una morfología poligonal en las células HEK293, las cuales tenían inicialmente una forma elongada y promovió la formación de protrusiones membranales extensas y la formación de lamelipodios. Tanto la disminución de la circularidad como de la redondez están relacionados con la formación de estas protrusiones membranales y con una morfología irregular, respectivamente. Adicionalmente, la GH promovió la formación de extensas protrusiones membranales permitiendo el elongamiento de las células HEK293. Por lo tanto, los valores de la relación de aspecto incrementaron proporcionalmente.

La GH potencia un fenotipo híbrido epitelial-mesenquimal en las células cancerosas HeLa, pero no en las células no cancerosas HEK293

La expresión de las proteínas E-cadherina (E-cad) y vimentina (vim) en las células cancerosas, ha sido ampliamente usada como marcadores moleculares de la TEM (Pastushenko & Blanpain, 2019b; Salt *et al.*, 2014). Es por ello por lo que, en este trabajo, después de observar los efectos que tuvo la GH en la dispersión, migración y cambios morfológicos en las células cancerosas, se evaluó la expresión de E-cad y vim mediante citometría de flujo para confirmar el papel de la GH en el proceso de la TEM. Inicialmente, las células fueron clasificadas de acuerdo con la expresión de E-cad y vim (Figura 9A). Las células que expresaban exclusivamente E-cad se clasificaron como células con fenotipo epitelial, mientras que las células que expresaban solo vim se clasificaron con fenotipo mesenquimal. Finalmente, aquellas células que expresaban tanto E-cad como vim se clasificaron como de fenotipo híbrido epitelial-mesenquimal.

Los resultados mostraron que la GH indujo la expresión de vimentina a las 12 h en las células HeLa (44.8 %, Figura 9B), favoreciendo un fenotipo mesenquimal en comparación con los cultivos en condiciones basales sin GH (19.2 %). Sin embargo, a las 24 h se incrementó la expresión de E-cad, aumentando el porcentaje de células con fenotipo híbrido (54.2 %) respecto a los cultivos en condiciones

control (31.6 %). Por el contrario, la GH no afectó los niveles de expresión de E-cad y vim en las células HEK293. Estos resultados sugieren que la GH promueve un fenotipo híbrido epitelial mesenquimal en las células cancerosas, pero no afecta a las células epiteliales no cancerosas, de la misma manera que lo hace el EGF.

DISCUSIÓN

La TEM es un evento relevante durante el desarrollo embrionario y la reparación tisular en la vida posnatal. Sin embargo, también se ha considerado un evento crucial en la progresión del cáncer desde las etapas iniciales hasta la adquisición de quimiorresistencia y metástasis (Pastushenko & Blanpain, 2019a). Estos hechos resaltan la relevancia de dilucidar el proceso de la TEM para comprender la enfermedad y diseñar tratamientos más efectivos. Diferentes moléculas producidas por el mismo tumor, por las células endoteliales o incluso por las células inmunes que forman parte del microambiente tumoral celular (MAT) pueden regular la TEM (Lamouille *et al.*, 2014; Ye & Weinberg, 2015).

En los últimos años, el papel de la GH en la oncogenicidad y la progresión del cáncer ha sido un tema de profundo interés científico. Diversos estudios han demostrado que células de cáncer mamario, colorrectal, endometrial y melanoma, en los que se ha inducido, mediante transfección del gen, la expresión autocrina de la GH, presentan rasgos de la TEM (revisado por Brittain *et al.*, 2017). Sin embargo, no está claro si la GH endocrina o exógena podría tener el mismo efecto. Anteriormente ya se ha reportado que la GH puede tener efectos diferenciales dependiendo de si la hormona tiene un origen exógeno o autocrino. Zhu *et al.* (2005) informaron que la producción autocrina de la GH aumenta la proliferación en células epiteliales mamarias, no así la aplicación exógena de la GH. Además, Nakonechnaya *et al.* (2013) reportaron que la sobreexpresión de GH autocrina en células de cáncer de próstata redujo la proliferación y aumentó la apoptosis, mientras que la GH exógena tuvo efectos opuestos.

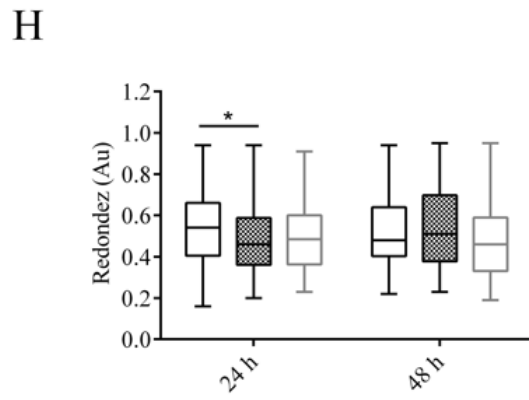
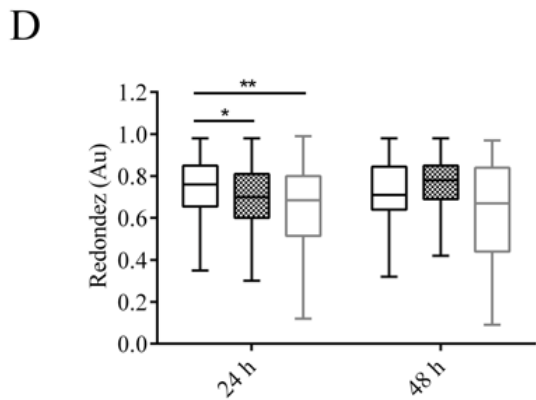
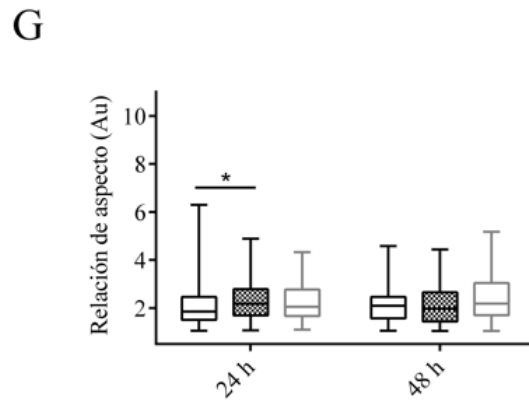
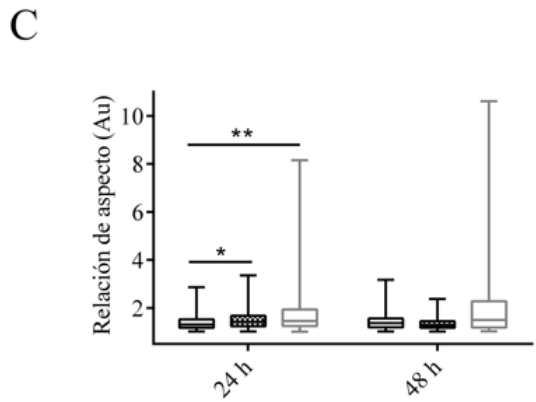
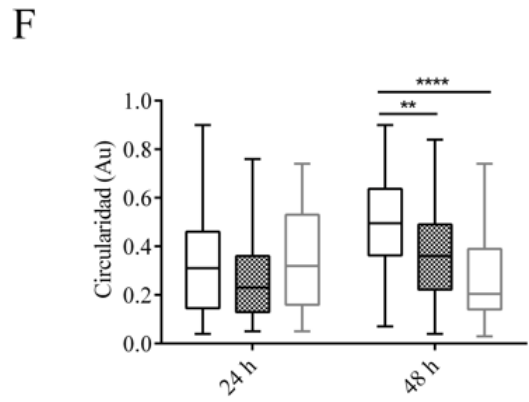
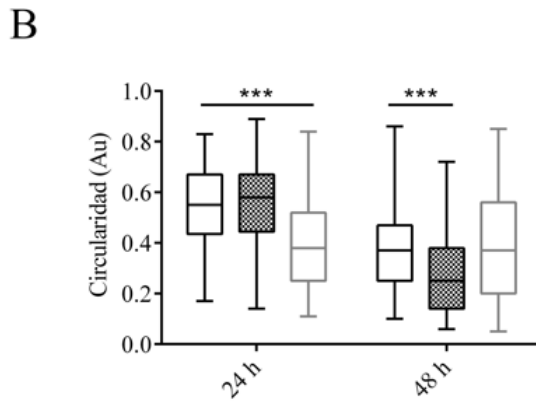
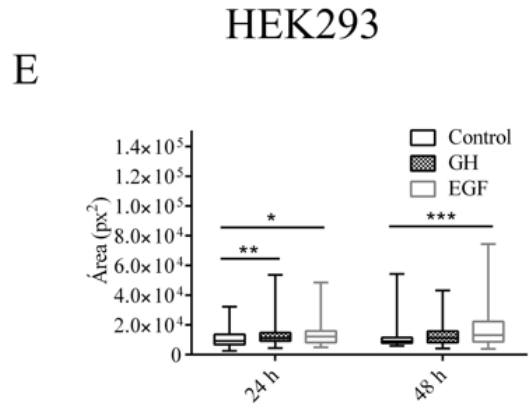
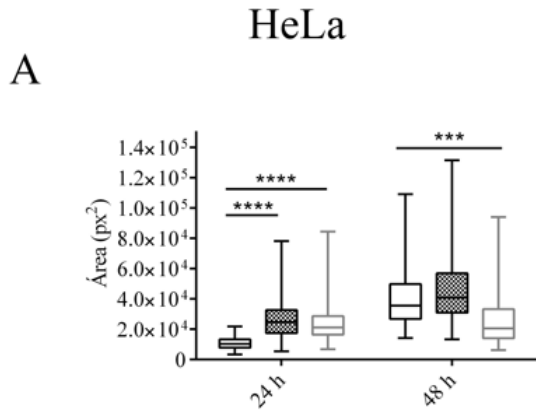


Figura 8. La GH aumenta el área de actina y la relación de aspecto y disminuye la circularidad y la redondez tanto en las células HeLa como en las células HEK293. Los parámetros morfológicos de las células (A, B, C, D) HeLa y (E, F, G, H) HEK293, como el área, la circularidad, la relación de aspecto y la redondez, se obtuvieron con el software ImageJ. Las colonias celulares de cada condición se fotografiaron al azar usando un microscopio de epifluorescencia. Los datos se representan en diagramas de caja, de dos experimentos independientes n=2 (se midieron alrededor de 45-125 células para cada condición). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

Entre otras diferencias significativas que se han encontrado entre la GH autocrina y la exógena es que la primera regula más de 300 genes en el carcinoma mamario humano, mientras que la GH exógena solo afecta a 167 genes (Zhu *et al.*, 2005). El efecto de la GH autocrina sobre el aumento de la regulación génica podría deberse a que la GH autocrina se une a su receptor desde el retículo endoplasmático, evitando así la degradación de GHR y favoreciendo la maduración del mismo (van den Eijnden y Strous, 2007). Los efectos contradictorios de la expresión de GH autocrina y exógena podrían explicar la evidencia controversial de la participación de la GH en la progresión del cáncer.

Si bien algunos estudios han reportado un mayor riesgo de cáncer en pacientes con niveles séricos excesivos de GH (acromegalia) (Deodati *et al.*, 2014; Swerdlow *et al.*, 2002), otros no han logrado establecer una relación causa-efecto entre el riesgo de cáncer y el uso terapéutico de la GH (Boguszewski & Boguszewski, 2019). A pesar de que no se ha podido declarar una relación directa entre la GH y el inicio y progresión del cáncer, la comunidad médica mantiene su preocupación por el uso de la GH como agente terapéutico en pacientes con crecimiento neoplásico, donde la hormona podría favorecer su progresión (Allen *et al.*, 2016). Considerando estos antecedentes, el presente trabajo evaluó el efecto de la GH exógena sobre la dispersión, migración y cambios morfológicos, así como la expresión de marcadores moleculares de la TEM en la línea celular de cáncer cervical HeLa y en la línea celular no cancerosa HEK293.

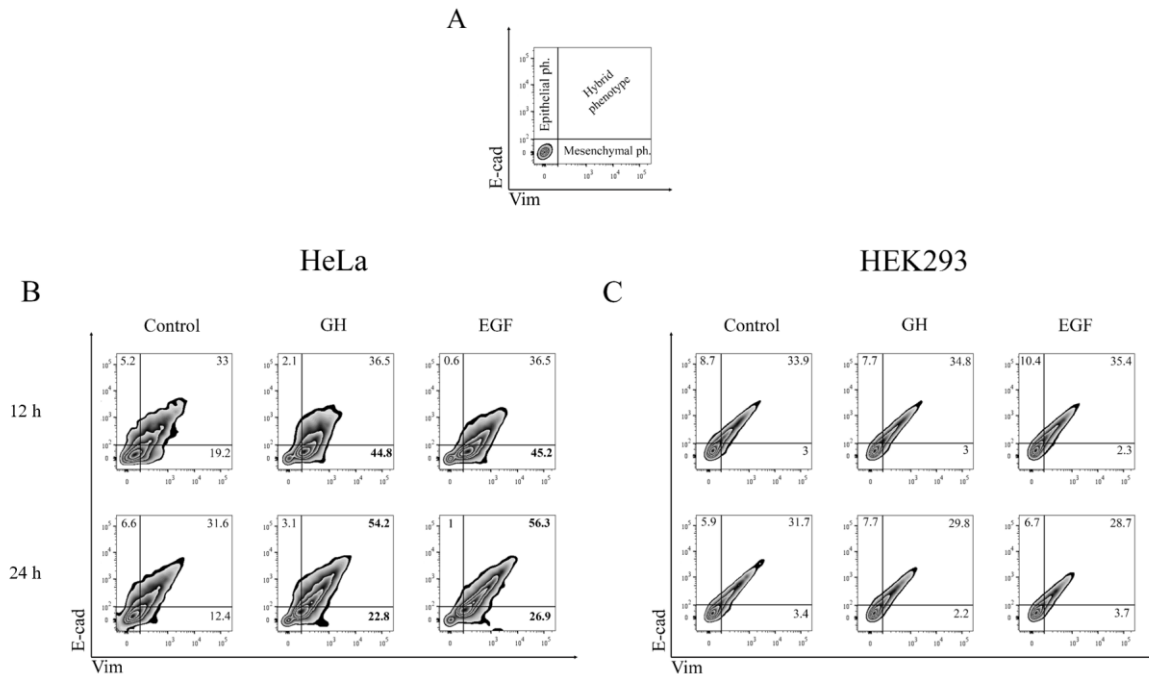


Figura 9. La GH potencia la expresión de vimentina, seguida de una inducción de un fenotipo híbrido epitelial-mesenquimal en células cancerosas HeLa, pero no afecta a las células no cancerosas HEK293. El panel A muestra la clasificación de las células del fenotipo EMT según la expresión de E-cadherina (E-cad) y vimentina (Vim) (fenotipo epitelial, híbrido o mesenquimal). Las células (B) HeLa y (C) HEK293 se incubaron con o sin GH (0, 100 ng/mL) o EGF (10 ng/mL) hasta las 12 y 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se tiñeron con anticuerpos anti-E-cadherina PE-Cy®7 y anti-vimentina PE y se fijaron con FA al 4%. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo BD LRS Fortessa y se analizaron con el software FlowJo®. Los números dentro de los recuadros representan porcentajes de células que expresan cada proteína. Los histogramas son representativos de dos experimentos independientes con la misma tendencia y hallazgos (n=2).

La línea celular HeLa fue la primera línea celular de cáncer humano establecida *in vitro* y ha sido ampliamente utilizada en la investigación biológica del cáncer. Por otro lado, aunque las células HEK293 se han considerado como células embrionarias "normales", poseen propiedades tumorigénicas en modelos murinos, probablemente debido a su alta inestabilidad genética (Stepanenko & Dmitrenko, 2015). Además, bajo ciertas condiciones de cultivo, las células HEK293 son capaces de experimentar la TEM (Fischer *et al.*, 2017), siendo un modelo adecuado para evaluar el papel de las moléculas exógenas durante este proceso. Es relevante mencionar que la concentración de GH utilizada en todos los experimentos (100 ng/ml) se puede alcanzar en condiciones fisiológicas o terapéuticas (Godfrey *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2007; Langbakke *et al.*, 2007; Olarescu *et al.*, 2000; Wideman *et al.*, 2002). El primer abordaje del estudio consistió en verificar la

sensibilidad de las líneas celulares HEK293 y HeLa al efecto de la GH. Para esto se analizó la expresión del GHR mediante citometría de flujo. Ambas líneas celulares presentaron una elevada expresión del GHR, desde el momento de la descongelación hasta la quinta transferencia.

En segundo lugar, evaluamos el efecto de la GH sobre la dispersión celular y la migración de ambas líneas celulares, eventos críticos en las primeras etapas de la TEM. De acuerdo con los resultados, la GH mejoró la dispersión celular y la migración de las células HeLa tras 48 h de incubación, pero no afectó a las células HEK293. El papel de la GH exógena en la migración celular se ha informado previamente en células inmunitarias como los timocitos, las células T periféricas y los macrófagos (dos Santos Reis *et al.*, 2018; Savino *et al.*, 2012; Smaniotto *et al.*, 2010). No obstante, estos estudios destacan que la GH ejerce un efecto quimioatrayente en sinergia con quimiocinas como CXCL12 y proteínas de matriz específicas como fibronectina y laminina.

Asimismo, se ha informado que la GH mejora la migración de las células epiteliales de la córnea, pero solo en co-cultivo con fibroblastos (Ding *et al.*, 2015). Por otra parte, existen antecedentes que muestran que la producción autocrina de GH regula la migración de células de cáncer de mama (Mukhina *et al.*, 2014;) en tanto que en células de cáncer de próstata, tanto la GH exógena como la autocrina favorecen su migración (Nakonechnaya & Shewchuk, 2015). Los mismos autores informaron que la GH por sí sola actúa como un agente quimioatrayente para estas células, sin necesidad de incluir algún sustrato o quimiocina. Estos antecedentes, junto con nuestros resultados sobre dispersión y migración de las células HeLa, sugieren que el efecto de la GH sobre estos procesos depende del fenotipo celular.

Tradicionalmente, las células HEK293 se han empleado como un modelo de células normales. Sin embargo, estas presentan una alta inestabilidad genética que les confiere propiedades tumorigénicas en periodos largos de cultivo. De acuerdo con Shen *et al.* (2008), las células HEK293 provenientes de subcultivos de menos de 52 transferencias no forman tumores en ratones después de ocho semanas de la inyección subcutánea. En cambio, las células provenientes de subcultivos de más

de 65 transferencias forman tumoraciones dos o cuatro semanas después de la inoculación. Basado en estas características de las células HEK293, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la GH puede afectar la dispersión y la migración solo en células con un fenotipo canceroso evidente, pero no en células con características similares a las de las primeras etapas de la carcinogénesis.

Contrario a los efectos observados de la GH sobre la dispersión y la migración, la hormona favoreció cambios morfológicos en ambas líneas celulares, HeLa y HEK293. Estudios previos han reportado que la GH exógena regula la reorganización del citoesqueleto de actina de células de ovario, fibroblastos y hepatocitos (Goh *et al.*, 1997) posiblemente a través de la regulación de la vía de señalización de la cinasa JAK-2 y la proteína adaptadora SH2B1 β , la cual regula directamente al citoesqueleto de actina y promueve la formación de filopodios (Diakonova *et al.*, 2002; Herrington *et al.*, 2000; Lanning & Carter-Su, 2007; Maures *et al.*, 2007; Rider *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha reportado que la GH autocrina regula la formación de microfilamentos de actina e incrementa el área de células de cáncer mamario (Kaulsay *et al.*, 2000), lo cual concuerda con los resultados observados en las células de cáncer cervical, HeLa.

La morfología que se ha asociado tradicionalmente con la TEM es la de tipo fibroblastoide. No obstante, el presente trabajo mostró que la GH no favorece esta morfología ni en las células HEK293 ni en las HeLa; en cambio, estas últimas células mostraron una morfología poligonal inducida por GH y un aumento en los filopodios distribuidos por toda la periferia celular. Aunque anteriormente la morfología poligonal no se había relacionado con la TEM, estudios recientes sugieren que no se necesita una morfología fibroblastoide para que las células expresen un fenotipo invasivo característico de la TEM. Incluso, en este proceso se han reportado tres morfologías diferentes -poligonal, huso y circular- (Devaraj & Bose, 2019).

Para confirmar que la GH exógena efectivamente favorece la TEM en las células HeLa y no en HEK293, se analizaron dos marcadores moleculares de dicha transición: E-cadherina y vimentina. El incremento en la expresión de vimentina se ha relacionado con el fenotipo celular mesenquimal y la disminución de la expresión

de E-cadherina, con el fenotipo epitelial. Esto se ha observado tanto en líneas celulares normales cuando son estimuladas con factores que les permite iniciar la TEM (Zhang *et al.*, 2014), como en tejido proveniente de pacientes con cáncer (Figiel *et al.*, 2017). De manera interesante, la GH no modificó la expresión de E-cadherina o vimentina en las células HEK293. Por el contrario, la GH disminuyó inicialmente la expresión de E-cadherina (12 h) en células HeLa y aumentó subsecuentemente la expresión de vimentina junto con un aumento tardío de la expresión de E-cadherina (24 h). Algunos estudios recientes han informado que la TEM se caracteriza por etapas intermedias donde las células pueden expresar simultáneamente marcadores epiteliales y mesenquimales. Inesperadamente, el fenotipo híbrido epitelial-mesenquimal se ha relacionado con una mayor eficiencia de las células para llevar a cabo la metástasis (Kröger *et al.*, 2019; Pastushenko *et al.*, 2018; Pastushenko & Blanpain, 2019a; Sulaiman *et al.*, 2018).

Específicamente, la expresión de E-cadherina que se observa en el fenotipo híbrido durante la TEM, puede funcionar como un mecanismo para evitar la muerte celular por anoikis, que ocurre como consecuencia de la pérdida de contactos célula-célula y célula-sustrato durante la intravasación en la cascada metastásica (Chao *et al.*, 2012; Lamouille *et al.*, 2014; Padmanaban *et al.*, 2019), mientras que la vimentina respalda su fenotipo mesenquimal. Nuestros resultados sugieren que la GH potencia parcialmente este fenotipo híbrido epitelial-mesenquimal en las células cancerosas, permitiéndoles tener una mayor tasa de supervivencia y facilitando que las células cancerosas lleguen con éxito a tejidos distantes (Aceto *et al.*, 2015), hipótesis que requiere ser investigada.

La relevancia científica del presente trabajo radica en la observación de que la GH exógena afecta preferentemente las propiedades de la TEM de las células cancerosas, pero no de las células sin fenotipo oncogénico evidente, lo que sugiere que esta hormona puede afectar la progresión del cáncer más que la oncogenicidad. En este sentido, estos resultados no respaldarían las preocupaciones médicas sobre el papel de la GH como factor cancerígeno, pero sí su influencia sobre la progresión de los tumores ya formados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aceto, N., Toner, M., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2015). En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends in Cancer*, *1*(1), 44–52.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.07.006>
- Allen, D. B., Backeljauw, P., Bidlingmaier, M., Biller, B. M. K., Boguszewski, M., Burman, P., Butler, G., Chihara, K., Christiansen, J., Cianfarani, S., Clayton, P., Clemmons, D., Cohen, P., Darendeliler, F., Deal, C., Dunger, D., Erfurth, E. M., Fuqua, J. S., Grimberg, A., ... Thorner, M. (2016). GH safety workshop position paper: A critical appraisal of recombinant human GH therapy in children and adults. *European Journal of Endocrinology*, *174*(2), P1–P9. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0873>
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., & Bray, F. (2019). Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: A worldwide analysis. *The Lancet Global Health*, *8*.
[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)
- Balasubramaniam, S. D., Balakrishnan, V., Oon, C. E., & Kaur, G. (2019). Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina*, *55*(7), 384.
<https://doi.org/10.3390/medicina55070384>
- Boguszewski, C. L., & Boguszewski, M. C. da S. (2019). Growth Hormone's Links to Cancer. *Endocrine Reviews*, *40*(2), 558–574.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00166>

- Brandenberger, G., Gronfier, C., Chapotot, F., Simon, C., & Piquard, F. (2000). Effect of sleep deprivation on overall 24 h growth-hormone secretion. *The Lancet*, 356(9239), 1408. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02847-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02847-6)
- Brittain, A. L., Basu, R., Qian, Y., & Kopchick, J. J. (2017). Growth Hormone and the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(10), 3662–3673. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01000>
- Brunet-Dunand, S. E., Vouyovitch, C., Araneda, S., Pandey, V., Vidal, L. J.-P., Print, C., Mertani, H. C., Lobie, P. E., & Perry, J. K. (2009). Autocrine Human Growth Hormone Promotes Tumor Angiogenesis in Mammary Carcinoma. *Endocrinology*, 150(3), 1341–1352. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0608>
- Cao, Y., Han, Q., Li, J., Jia, Y., Zhang, R., & Shi, H. (2020). P4HA2 contributes to cervical cancer progression via inducing epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cancer*, 11(10), 2788–2799. <https://doi.org/10.7150/jca.38401>
- Carroll, P. V. (1998). *Growth Hormone Deficiency in Adulthood and the Effects of Growth Hormone Replacement: A Review*. 83(2), 14.
- Chao, Y., Wu, Q., Shepard, C., & Wells, A. (2012). Hepatocyte induced re-expression of E-cadherin in breast and prostate cancer cells increases chemoresistance. *Clinical & Experimental Metastasis*, 29(1), 39–50. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9427-3>
- Chen, Y.-J., You, M.-L., Chong, Q.-Y., Pandey, V., Zhuang, Q.-S., Liu, D.-X., Ma, L., Zhu, T., & Lobie, P. (2017). Autocrine Human Growth Hormone Promotes Invasive and Cancer Stem Cell-Like Behavior of Hepatocellular

Carcinoma Cells by STAT3 Dependent Inhibition of CLAUDIN-1 Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1274.

<https://doi.org/10.3390/ijms18061274>

Dehari, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., & Nakayama, H. (2008). Increased Nuclear Expression of Growth Hormone Receptor in Uterine Cervical Neoplasms of Women under 40 Years Old. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 216(2), 165–172.

<https://doi.org/10.1620/tjem.216.165>

Deodati, A., Ferroli, B. B., & Cianfarani, S. (2014). Association between growth hormone therapy and mortality, cancer and cardiovascular risk: Systematic review and meta-analysis. *Growth Hormone & IGF Research*, 24(4), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2014.02.001>

Devaraj, V., & Bose, B. (2019). Morphological State Transition Dynamics in EGF-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), 911. <https://doi.org/10.3390/jcm8070911>

Di, J., Huang, H., Qu, D., Tang, J., Cao, W., Lu, Z., Cheng, Q., Yang, J., Bai, J., Zhang, Y., & Zheng, J. (2015). Rap2B promotes proliferation, migration and invasion of human breast cancer through calcium-related ERK1/2 signaling pathway. *Scientific Reports*, 5(1), 12363. <https://doi.org/10.1038/srep12363>

Diakonova, M., Gunter, D. R., Herrington, J., & Carter-Su, C. (2002). SH2-B β Is a Rac-binding Protein That Regulates Cell Motility. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10669–10677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M1111138200>

- Diepenbruck, M., & Christofori, G. (2016). Epithelial–mesenchymal transition (EMT) and metastasis: Yes, no, maybe? *Current Opinion in Cell Biology*, 43, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>
- Ding, J., Wirostko, B., & Sullivan, D. A. (2015). Human Growth Hormone Promotes Corneal Epithelial Cell Migration in Vitro. *Cornea*, 34(6), 686–692. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000418>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- dos Santos Reis, M. D., dos Santos, Y. M. O., de Menezes, C. A., Borbely, K. S. C., & Smaniotto, S. (2018). Resident murine macrophage migration and phagocytosis are modulated by growth hormone: GH stimulates macrophage function. *Cell Biology International*, 42(5), 615–623. <https://doi.org/10.1002/cbin.10939>
- Fabisiewicz, A., Szostakowska-Rodzios, M., Zaczek, A. J., & Grzybowska, E. A. (2020). Circulating Tumor Cells in Early and Advanced Breast Cancer; Biology and Prognostic Value. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1671. <https://doi.org/10.3390/ijms21051671>
- Fang, J. S., Gillies, R. D., & Gatenby, R. A. (2008). Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*, 18(5), 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.011>
- Figiel, S., Vasseur, C., Bruyere, F., Rozet, F., Maheo, K., & Fromont, G. (2017). Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate

- cancer. *Human Pathology*, 61, 26–32.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.10.013>
- Fischer, V., Wong, M., Li, F.-Q., & Takemaru, K.-I. (2017). Chibby1 knockdown promotes mesenchymal-to-epithelial transition-like changes. *Cell Cycle*, 16(5), 448–456. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1281478>
- Flores-Morales, A., Greenhalgh, C. J., Norstedt, G., & Rico-Bautista, E. (2006). Negative Regulation of Growth Hormone Receptor Signaling. *Molecular Endocrinology*, 20(2), 241–253. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0170>
- Fram, S. T., Wells, C. M., & Jones, G. E. (2011). HGF-Induced DU145 Cell Scatter Assay. In C. M. Wells & M. Parsons (Eds.), *Cell Migration* (Vol. 769, pp. 31–40). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_3
- Gan, Y., Shi, C., Inge, L., Hibner, M., Balducci, J., & Huang, Y. (2010). Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. *Oncogene*, 29(35), 4947–4958.
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.240>
- Gebre-Medhin, M., Kindblom, L.-G., Wennbo, H., Törnell, J., & Meis-Kindblom, J. M. (2001). Growth Hormone Receptor Is Expressed in Human Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 158(4), 1217–1222.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64071-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64071-0)
- Genna, A., Vanwynsberghe, A. M., Villard, A. V., Pottier, C., Ancel, J., Polette, M., & Gilles, C. (2020). EMT-Associated Heterogeneity in Circulating Tumor Cells: Sticky Friends on the Road to Metastasis. *Cancers*, 12(6), 1632.
<https://doi.org/10.3390/cancers12061632>

- Goh, E. L. K., Pircher, T. J., Wood, T. J. J., Norstedt, G., Graichen, R., & Lobie, P. E. (1997). Growth Hormone-Induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton Is Not Required for STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription-5)-Mediated Transcription. *Endocrinology*, *138*(8), 9. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5298>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Herrington, J., Diakonova, M., Rui, L., Gunter, D. R., & Carter-Su, C. (2000). SH2-B Is Required for Growth Hormone-induced Actin Reorganization. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(17), 13126–13133. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.13126>
- Hou, L., Chen, Z., Liu, D., Cheng, Y., & Luo, X. (2015). Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of a PEGylated recombinant human growth hormone and daily recombinant human growth hormone in growth hormone-deficient children. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*, 13–21. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93183>
- Jeon, S.-Y., Hwang, K.-A., & Choi, K.-C. (2016). Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *158*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.005>
- Johannsson, G., Bidlingmaier, M., Biller, B. M. K., Boguszewski, M., Casanueva, F. F., Chanson, P., Clayton, P. E., Choong, C. S., Clemmons, D., Dattani, M., Frystyk, J., Ho, K., Hoffman, A. R., Horikawa, R., Juul, A., Kopchick, J. J., Luo, X., Neggers, S., Netchine, I., ... _____. (2018). Growth Hormone Research

Society perspective on biomarkers of GH action in children and adults. *Endocrine Connections*, 7(3), R126–R134. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0047>

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>

Kaulsay, K. K., Mertani, H. C., Lee, K.-O., & Lobie, P. E. (2000). Autocrine Human Growth Hormone Enhancement of Human Mammary Carcinoma Cell Spreading Is Jak2 Dependent*. *Endocrinology*, 141(4), 1571–1584. <https://doi.org/10.1210/endo.141.4.7426>

Kaulsay, K. K., Mertani, H. C., Törnell, J., Morel, G., Lee, K.-O., & Lobie, P. E. (1999). Autocrine Stimulation of Human Mammary Carcinoma Cell Proliferation by Human Growth Hormone. *Experimental Cell Research*, 250(1), 35–50. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4492>

Keller, A., Wu, Z., Kratzsch, J., Keller, E., Blum, W. F., Kniess, A., Preiss, R., Teichert, J., Strasburger, C. J., & Bidlingmaier, M. (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GH: Dependence on route and dosage of administration. *European Journal of Endocrinology*, 156(6), 647–653. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0057>

Kemp, S., & Frindik, J. P. (2011). Emerging options in growth hormone therapy: An update. *Drug Design, Development and Therapy*, 411. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S23140>

Kim, H., Choi, J.-A., & Kim, J.-H. (2014). Ras Promotes Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-induced Epithelial-Mesenchymal Transition via a

Leukotriene B4 Receptor-2-linked Cascade in Mammary Epithelial Cells.
Journal of Biological Chemistry, 289(32), 22151–22160.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556126>

Kim, Y. M., Muthuramalingam, K., & Cho, M. (2020). Redox Regulation of NOX Isoforms on FAK(Y397)/SRC(Y416) Phosphorylation Driven Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Malignant Cervical Epithelial Cells. *Cells*, 9(6), 1555. <https://doi.org/10.3390/cells9061555>

Kölbl, A., Jeschke, U., & Andergassen, U. (2016). The Significance of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for Circulating Tumor Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms17081308>

Kröger, C., Afeyan, A., Mraz, J., Eaton, E. N., Reinhardt, F., Khodor, Y. L., Thiru, P., Bierie, B., Ye, X., Burge, C. B., & Weinberg, R. A. (2019). Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(15), 7353–7362. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812876116>

Lai, J.-K., Wu, H.-C., Shen, Y.-C., Hsieh, H.-Y., Yang, S.-Y., & Chang, C.-C. (2012). Krüppel-like factor 4 is involved in cell scattering induced by hepatocyte growth factor. *Journal of Cell Science*, jcs.108910. <https://doi.org/10.1242/jcs.108910>

Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>

- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Landry, J. J. M., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J. O., Huber, W., & Steinmetz, L. M. (2013). The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, *3*(8), 1213–1224. <https://doi.org/10.1534/g3.113.005777>
- Langbakke, I. H., Nielsen, J. N., Skettrup, M. P., Harper, A., Klitgaard, T., Weil, A., Engelhardt, E., & Lange, M. (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of growth hormone in patients on chronic haemodialysis compared with matched healthy subjects: An open, nonrandomized, parallel-group trial. *Clinical Endocrinology*, *67*(5), 776–783. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02962.x>
- Lanning, N. J., & Carter-Su, C. (2007). Recent advances in growth hormone signaling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *7*(4), 225–235. <https://doi.org/10.1007/s11154-007-9025-5>
- Larue, L., & Bellacosa, A. (2005). Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: Role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, *24*(50), 7443–7454. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209091>
- Lea, R. W., Dawson, T., Martinez-Moreno, C. G., El-Abry, N., & Harvey, S. (2015). Growth hormone and cancer: GH production and action in glioma? *General*

and Comparative Endocrinology, 220, 119–123.

<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.06.011>

Lee, M.-Y., Chou, C.-Y., Tang, M.-J., & Shen, M.-R. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cervical Cancer: Correlation with Tumor Progression, Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression, and Snail Up-Regulation. *Clinical Cancer Research*, 14(15), 4743–4750.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0234>

Lee, M.-Y., & Shen, M.-R. (2012). Epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma. *American Journal of Translational Research*, 4(1), 1–13.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3276374/>

Lee, S. I., & Atri, M. (2019). 2018 FIGO Staging System for Uterine Cervical Cancer: Enter Cross-sectional Imaging. *Radiology*, 292(1), 15–24.

<https://doi.org/10.1148/radiol.2019190088>

Lin, M., Ye, M., Zhou, J., Wang, Z. P., & Zhu, X. (2019). Recent Advances on the Molecular Mechanism of Cervical Carcinogenesis Based on Systems Biology Technologies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.02.001>

Liu, F.-T., Wu, Z., Yan, J., Norman, R. J., & Li, R. (2020). The Potential Role of Growth Hormone on the Endometrium in Assisted Reproductive Technology. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 49.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00049>

Lyons, S. M., Alizadeh, E., Mannheimer, J., Schuamberg, K., Castle, J., Schroder, B., Turk, P., Thamm, D., & Prasad, A. (2016). Changes in cell shape are

- correlated with metastatic potential in murine and human osteosarcomas. *Biology Open*, 5(3), 289–299. <https://doi.org/10.1242/bio.013409>
- Maures, T. J., Kurzer, J. H., & Carter-Su, C. (2007). SH2B1 (SH2-B) and JAK2: A multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.11.007>
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), 117–134. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>
- Mukhina, S., Mertani, H. C., Guo, K., Lee, K.-O., Gluckman, P. D., & Lobie, P. E. (2004). Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(42), 15166–15171. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405881101>
- Nakonechnaya, A. O., Jefferson, H. S., Chen, X., & Shewchuk, B. M. (2013). Differential effects of exogenous and autocrine growth hormone on LNCaP prostate cancer cell proliferation and survival. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(6), 1322–1335. <https://doi.org/10.1002/jcb.24473>
- Nakonechnaya, A. O., & Shewchuk, B. M. (2015). Growth hormone enhances LNCaP prostate cancer cell motility. *Endocrine Research*, 40(2), 97–105. <https://doi.org/10.3109/07435800.2014.966383>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>

- Padmanaban, V., Krol, I., Suhail, Y., Szczerba, B. M., Aceto, N., Bader, J. S., & Ewald, A. J. (2019). E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature*, *573*(7774), 439–444.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1526-3>
- Pandey, V., Perry, J. K., Mohankumar, K. M., Kong, X.-J., Liu, S.-M., Wu, Z.-S., Mitchell, M. D., Zhu, T., & Lobie, P. E. (2008). Autocrine Human Growth Hormone Stimulates Oncogenicity of Endometrial Carcinoma Cells. *Endocrinology*, *149*(8), 3909–3919. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0286>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019a). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, *29*(3), 212–226.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019b). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, *29*(3), 212–226.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., De Clercq, S., Minguijón, E., Balsat, C., Sokolow, Y., Dubois, C., De Cock, F., Scozzaro, S., Sopena, F., Lanas, A., ... Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, *556*(7702), 463–468.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>
- Perry, J. K., Liu, D.-X., Wu, Z.-S., Zhu, T., & Lobie, P. E. (2013). Growth hormone and cancer: An update on progress. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, *20*(4), 307–313.
<https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328363183a>

- Perry, J. K., Wu, Z.-S., Mertani, H. C., Zhu, T., & Lobie, P. E. (2017). Tumour-Derived Human Growth Hormone As a Therapeutic Target in Oncology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(8), 587–596.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.003>
- Qureshi, R., Arora, H., & Rizvi, M. A. (2015). EMT in cervical cancer: Its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Letters*, 356(2), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.021>
- Ran, J., Lin, D.-L., Wu, R.-F., Chen, Q.-H., Huang, H.-P., Qiu, N.-X., & Quan, S. (2015). ZEB1 promotes epithelial–mesenchymal transition in cervical cancer metastasis. *Fertility and Sterility*, 103(6), 1606-1614.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.03.016>
- Rider, L., Tao, J., Snyder, S., Brinley, B., Lu, J., & Diakonova, M. (2009). Adapter Protein SH2B1 β Cross-Links Actin Filaments and Regulates Actin Cytoskeleton. *Molecular Endocrinology*, 23(7), 1065–1076.
<https://doi.org/10.1210/me.2008-0428>
- Salt, M. B., Bandyopadhyay, S., & McCormick, F. (2014). Epithelial-to-Mesenchymal Transition Rewires the Molecular Path to PI3K-Dependent Proliferation. *Cancer Discovery*, 4(2), 186–199.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0520>
- Savino, W., Smaniotto, S., Mendes-da-Cruz, D. A., & Dardenne, M. (2012). Growth hormone modulates migration of thymocytes and peripheral T cells: Growth hormone modulates T cell migration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1261(1), 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06637.x>

- Shafiei, F., Rahnama, F., Pawella, L., Mitchell, M. D., Gluckman, P. D., & Lobie, P. E. (2008). DNMT3A and DNMT3B mediate autocrine hGH repression of plakoglobin gene transcription and consequent phenotypic conversion of mammary carcinoma cells. *Oncogene*, *27*(18), 2602–2612.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210917>
- Shen, C., Gu, M., Song, C., Miao, L., Hu, L., Liang, D., & Zheng, C. (2008). The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured in vitro. *Biologicals*, *36*(4), 263–268.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2008.02.002>
- Small, W., Bacon, M. A., Bajaj, A., Chuang, L. T., Fisher, B. J., Harkenrider, M. M., Jhingran, A., Kitchener, H. C., Mileskin, L. R., Viswanathan, A. N., & Gaffney, D. K. (2017). Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*, *123*(13), 2404–2412. <https://doi.org/10.1002/cncr.30667>
- Smaniotto, S., Mendes-da-Cruz, D. A., Carvalho-Pinto, C. E., Araujo, L. M., Dardenne, M., & Savino, W. (2010). Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24*(3), 451–461.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.11.014>
- Spiliotis, B. (2008). Recombinant human growth hormone in the treatment of Turner syndrome. *Therapeutics and Clinical Risk Management, Volume 4*, 1177–1183. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S1440>
- Sridaran, D., Ramamoorthi, G., MahaboobKhan, R., & Kumpati, P. (2016). Oxystressed tumor microenvironment potentiates epithelial to mesenchymal transition and alters cellular bioenergetics towards cancer progression.

Tumor Biology, 37(10), 13307–13322. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5224-6>

Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: Phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182–190.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>

Subramani, R., Lopez-Valdez, R., Salcido, A., Boopalan, T., Arumugam, A., Nandy, S., & Lakshmanaswamy, R. (2014). Growth hormone receptor inhibition decreases the growth and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Experimental & Molecular Medicine*, 46(10), e117–e117.
<https://doi.org/10.1038/emm.2014.61>

Sulaiman, A., Yao, Z., & Wang, L. (2018). Re-evaluating the role of epithelial-mesenchymal-transition in cancer progression. *Journal of Biomedical Research*, 32(2), 81–90. <https://doi.org/10.7555/JBR.31.20160124>

Sun, J., Wang, S., Liu, P., & Liu, Y. (2020). MiR-139-5p-ZEB1 is a Molecular Regulator of Growth, Invasion, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Cervical Cancer. *Cancer Management and Research*, 12, 12723–12733.
<https://doi.org/10.2147/CMAR.S267634>

Swerdlow, A., Higgins, C., Adlard, P., & Preece, M. (2002). Risk of cancer in patients treated with human pituitary growth hormone in the UK, 1959–85: A cohort study. *The Lancet*, 360(9329), 273–277.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09519-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09519-3)

- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649–5669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>
- Toffoletto, O., Afiune, J., Thiemann, J. E., Khandave, S. S., Patel, S., & Rodrigues, D. G. (2016). Comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation between a new biosimilar and reference recombinant human growth hormone. *Growth Hormone & IGF Research*, 30–31, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2016.09.003>
- van Bunderen, C. C., van Varsseveld, N. C., Erfurth, E. M., Ket, J. C. F., & Drent, M. L. (2014). Efficacy and safety of growth hormone treatment in adults with growth hormone deficiency: A systematic review of studies on morbidity. *Clinical Endocrinology*, 81(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/cen.12477>
- van den Eijnden, M. J., & Strous, G. J. (2007). Autocrine Growth Hormone: Effects on Growth Hormone Receptor Trafficking and Signaling. *Molecular Endocrinology*, 21(11), 2832–2846. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0092>
- van Dijk, M., Mulder, P., Houdijk, M., Mulder, J., Noordam, K., Odink, R. J., Rongen-Westerlaken, C., Voorhoeve, P., Waelkens, J., Stokvis-Brantsma, J., & Hokken-Koelega, A. (2006). High Serum Levels of Growth Hormone (GH) and Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) during High-Dose GH Treatment in Short Children Born Small for Gestational Age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(4), 1390–1396. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1663>

- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vanharanta, S., & Massagué, J. (2013). Origins of Metastatic Traits. *Cancer Cell*, 24(4), 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.007>
- Vijayakumar, A., Novosyadlyy, R., Wu, Y., Yakar, S., & LeRoith, D. (2010). Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Hormone & IGF Research*, 20(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2009.09.002>
- von Laue, S., Finidori, J., Maamra, M., Shen, X., Justice, S., Dobson, P., & Ross, R. (2000). Stimulation of endogenous GH and interleukin-6 receptors selectively activates different Jaks and Stats, with a Stat5 specific synergistic effect of dexamethasone. *Journal of Endocrinology*, 165(2), 301–311. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1650301>
- Wang, J., Wu, Z., Pandey, V., Chen, Y., Zhu, T., & Lobie, P. (2014). 132: Autocrine human growth hormone suppression of E-cadherin via p44/42 MAPK promotes epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal carcinoma cells. *European Journal of Cancer*, 50, S29. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(14\)50112-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(14)50112-8)
- Waters, M. J. (2016). The growth hormone receptor. *Growth Hormone & IGF Research*, 28, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2015.06.001>
- Weingarten, C., Jenudi, Y., Tshuva, R. Y., Moskovich, D., Alfandari, A., Hercbergs, A., Davis, P. J., Ellis, M., & Ashur-Fabian, O. (2018). The Interplay Between Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and the Thyroid Hormones- $\alpha\beta 3$

Axis in Ovarian Cancer. *Hormones and Cancer*, 9(1), 22–32.

<https://doi.org/10.1007/s12672-017-0316-3>

Woodman, C. B. J., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>

Wu, Z.-S., Yang, K., Wan, Y., Qian, P.-X., Perry, J. K., Chiesa, J., Mertani, H. C., Zhu, T., & Lobie, P. E. (2011). Tumor Expression of Human Growth Hormone and Human Prolactin Predict a Worse Survival Outcome in Patients with Mammary or Endometrial Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10), E1619–E1629. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1245>

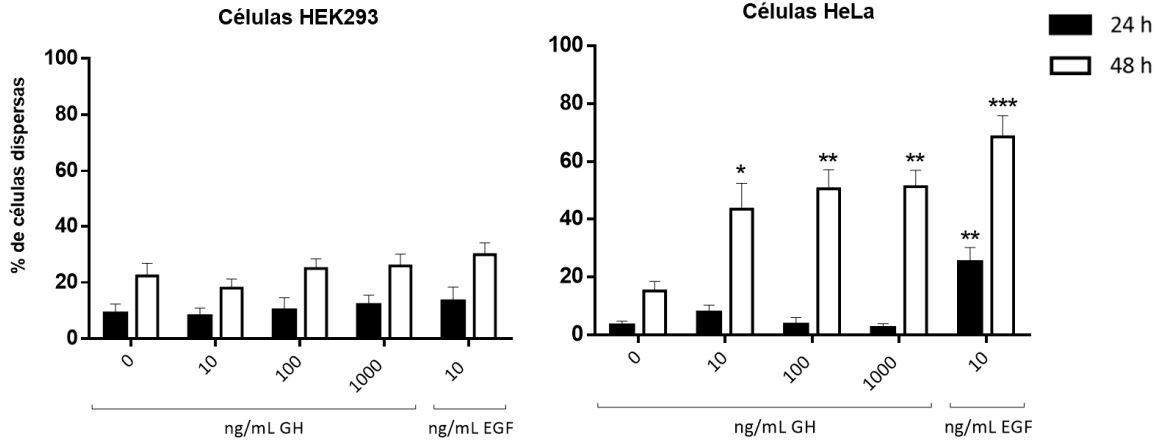
Ye, X., & Weinberg, R. A. (2015). Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 675–686. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.012>

Zhang, J., Tian, X.-J., Zhang, H., Teng, Y., Li, R., Bai, F., Elankumaran, S., & Xing, J. (2014). TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. *Cell Biology*, 7(345), 12. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005304>

Zhu, T., Starling-Emerald, B., Zhang, X., Lee, K.-O., Gluckman, P. D., Mertani, H. C., & Lobie, P. E. (2005). Oncogenic Transformation of Human Mammary Epithelial Cells by Autocrine Human Growth Hormone. *Cancer Research*, 65(1), 8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.317.65.1>

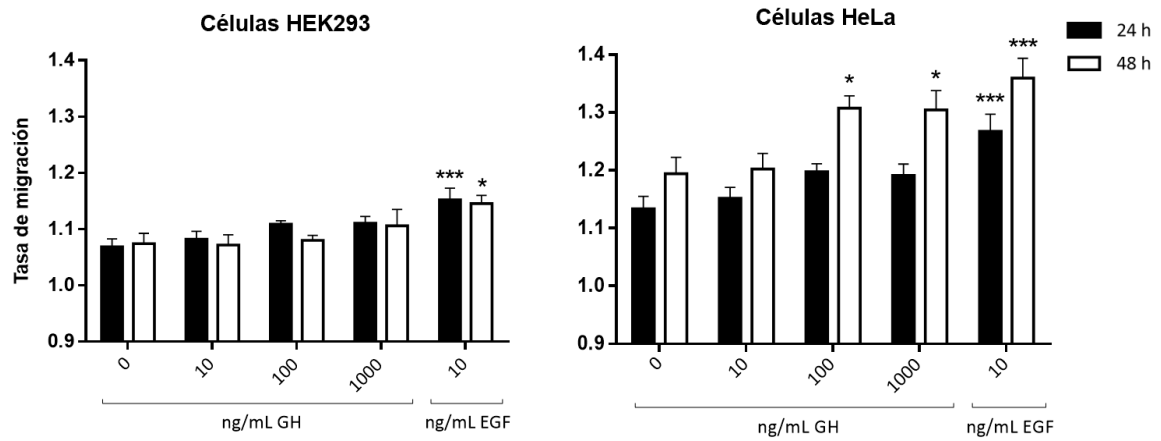
ANEXOS

ANEXO 1



Efecto de diferentes concentraciones de GH sobre la dispersión celular de las líneas celulares HEK293 y HeLa (0, 10, 100 y 1000 ng/mL de GH).

ANEXO 2



Efecto de diferentes concentraciones de GH sobre la migración celular de las líneas celulares HEK293 y HeLa (0, 10, 100 y 1000 ng/mL GH).