

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



***“ESTUDIO DE LA FOSFOLIPASA D EN LOS MECANISMOS DE
MIGRACIÓN INDUCIDOS POR ÁCIDO LINOLEICO EN CÉLULAS DE
CÁNCER DE MAMA MDA-MB-231”***

Tesis que para obtener el grado de maestro en Biología Experimental
presenta

Biol. Exp. Ricardo Díaz Aragón

Comité Tutorial

CODIRECTOR INTERNO: Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

Departamento de Ciencias Naturales, UAM-Cuajimalpa.

CODIRECTOR EXTERNO: Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN.

ASESOR: Dr. Pedro Cortés Reynosa

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN.

México D.F. Julio de 2014

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 284106

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **“Estudio de la fosfolipasa D en los mecanismos de migración inducidos por ácido linoleico en células de cáncer de mama MDA-MB-231”**, que presentó:

Biol. Exp. Ricardo Díaz Aragón

El día 08 de julio del año 2014

SINODALES

Presidente: Dr. Pedro Cortés Reynosa

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN.

Secretario: Dr. Napoleón Navarro Tito

Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero.

Vocal: Dr. Sócrates Villegas Comonfort

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, IFC, UNAM.

Vocal: Dr. Roberto Espinosa Neira

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, IBT, UNAM.

Vocal: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-Izt.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00133

Matricula: 2123800995

ESTUDIO DE LA FOSFOLIPASA D EN LOS MECANISMOS DE MIGRACION INDUCIDOS POR ACIDO LINOLEICO EN CELULAS DE CANCER DE MAMA MDA-MB-231

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 8 del mes de julio del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. PEDRO CORTES REYNOSA
- DR. SOCRATES VILLEGAS COMONFORT
- DR. ROBERTO ESPINOSA NEIRA
- DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
- DR. NAPOLEON NAVARRO TITO



RICARDO DIAZ ARAGON
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: RICARDO DIAZ ARAGON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. PEDRO CORTES REYNOSA

VOCAL

DR. SOCRATES VILLEGAS COMONFORT

VOCAL

DR. ROBERTO ESPINOSA NEIRA

VOCAL

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

SECRETARIO

DR. NAPOLEON NAVARRO TITO

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTOR INTERNO: Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

Departamento de Ciencias Naturales, UAM-Cuajimalpa.

CODIRECTOR EXTERNO: Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN.

ASESOR: Dr. Pedro Cortés Reynosa

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco al Dr. Eduardo Pérez Salazar por haber confiado en mi persona y brindarme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por proporcionarme las herramientas necesarias y el apoyo para la realización de este proyecto de investigación y por hacer grata mi estancia en el laboratorio 42. Mi más profundo agradecimiento para usted doctor.

A mi comité tutorial: A la Dra. Claudia Haydée González de la Rosa por su apoyo incondicional y seguimiento en todo el proceso de elaboración de tesis. Al Dr. Pedro Cortés Reynosa por su asesoría, su apoyo en el laboratorio y las observaciones realizadas al presente trabajo.

Al jurado de examen de grado: Al Dr. Napoleón Navarro Tito, al Dr. Sócrates Villegas Comonfort, al Dr. Roberto Espinosa Neira, por las correcciones realizadas a la tesis y evaluación del trabajo.

A la técnico del laboratorio 42 de Biología Celular del CINVESTAV: Nora Araceli Ruiz Durán por su asistencia técnica para la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 42 que me apoyaron durante la realización del proyecto: Cesi, Christian, Nathy, Emmanuel, Pedro, Cleo, Rocio, Octavio, Javier y Alejandra. Gracias infinitas.

A mi jefa Nathy por su paciencia, sus consejos y su apoyo durante mi estancia en el laboratorio 42.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor a mi familia que me acompaño en esta aventura que significó la maestría y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. Porque, desde un principio y hasta el día de hoy, siguen dándome ánimo para terminar este proceso.

Los quiero mucho!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

RESUMEN

Estudios epidemiológicos y en modelos animales sugieren una relación entre altos niveles de ingesta de ácidos grasos en la dieta y un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama. Particularmente, los ácidos grasos libres (AGL) están involucrados en diversos procesos, incluyendo proliferación, migración e invasión, en células de cáncer de mama. El ácido linoleico (AL) es un ácido graso poliinsaturado ω -6 que es conocido para inducir proliferación y migración en células de cáncer de mama. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual modula la migración no ha sido bien estudiado.

Una enzima asociada a los procesos de migración durante la progresión tumoral es la fosfolipasa D (PLD), de manera específica, se ha determinado una desregulación de la actividad de fosfolipasa D1 (PLD1) en células de cáncer de mama. Aquí nosotros mostramos que el AL induce migración en células de cáncer de mama MDA-MB-231 e incluso de células de epitelio mamario no tumoral MCF10A de manera dependiente de la actividad de la PLD1.

Por otro lado, la formación de contactos focales inducidos por AL requiere de la actividad de PLD1, pero no así, la actividad de PLD2. Por último, nosotros mostramos que el AL es capaz de potenciar la activación de NF κ B, un factor de transcripción constitutivamente activo en células de cáncer de mama, y que además, lo desencadena por un mecanismo molecular independiente de la actividad de la PLD.

En conclusión, en el presente trabajo mostramos que el AL induce migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 a través de un mecanismo que implica la actividad de la PLD1.

ABSTRACT

Epidemiologic studies and animal models suggest a link between high intake of fatty acids in the diet and an increased risk of developing breast cancer. Particularly, free fatty acids (FFA) are involved in several processes, including proliferation, migration and invasion, in breast cancer cells. Linoleic acid (LA) is a dietary ω -6 polyunsaturated fatty acid that is known to induce proliferation and migration in breast cancer cells. However the molecular mechanism by which is modulated the migration has not been well studied.

An associated enzyme in the process of migration during the tumor progression is the phospholipase D (PLD), in specific manner it has determined a deregulation in the activity of phospholipase D1 (PLPD1) in breast cancer cells. Here we show that the LA induce migration in breast cancer cells MDA-MB-231, in the same way, it has been observed that in non-tumor cells of epithelium breast MCF10A in a dependent manner activity for the PLD1.

In another manner, the formation of focal contacts induces by LA require the activity of PLD1, but not the activity of PLD2. Finally, we show that LA potentiates the NF κ B activation, which is a constitutively active transcription factor in breast cancer cells, and is triggered by an independent molecular mechanism of PLD activity.

In conclusion, in this work we show that the LA induces migration in breast cancer cells MDA-MB-231 through the mechanism that implies the PLD1 activity.

Índice

Índice	viii
Abreviaturas.....	x
Introducción	1
Estructura, función de la glándula mamaria y cáncer de mama.....	2
Factores de riesgo.....	3
Ácidos grasos y cáncer de mama	3
Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	5
Transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico.....	6
Fosfolipasa D	8
Factor de transcripción NFκB.....	8
Migración celular en cáncer	9
Formación de complejos de adhesión focal	10
Antecedentes.....	12
Justificación	13
Pregunta de investigación.....	14
Hipótesis	14
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares	15
Material y métodos	16
Reactivos	16
Cultivos celulares	16

Estimulación de células.....	17
Preparación de extractos nucleares para EMSA.....	17
Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)	17
Ensayo de migración mediante cierre de herida o <i>scratch</i>	18
Ensayo de migración en cámaras de Boyden	18
Inmunofluorescencia	19
Análisis estadístico.....	19
Resultados.....	20
La migración celular inducida por AL es dependiente de la actividad de la PLD.....	20
AL induce la formación de contactos focales durante la migración celular en células de cáncer de mama.	25
AL promueve la unión al ADN del factor de transcripción NFκB a través de una vía independiente de PLD en células MDA-MB-231	27
Discusión	31
Conclusiones	35
Perspectivas	36
Referencias.....	37

ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico

AG: Ácidos grasos

AGL: Ácidos grasos libres

ALA: Ácido α -linolénico

AL: Ácido linoleico

AP: Ácido fosfatídico

AS: Ácido esteridónico

DAG: Diacilglicerol

DHA: Ácido docosahexaenoico

DPA: Ácido docosapentaenoico

EPA: Ácido eicosapentaenoico

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FAK: Cinasa de adhesión focal

GEF: Factores de intercambio de nucleótidos de guanina

GLA: Ácido γ -linolénico

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G

GRKs: Cinasas de GPCR

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

GTPasas: Trifosfatasa de guanisona

IL-1 β : Interleucina-1 β

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato

LPA: Ácido lisofosfatídico

MAPKs: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MB: Membrana basal

MEC: Matriz extracelular

MMP: Metaloproteasas de matriz

MUFAs: Ácidos grasos monoinsaturados

NF κ B: Factor nuclear κ B

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKA: Proteína cinasa A

PKC: Proteína cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D

PPARs: Receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

RTK: Receptores con actividad catalítica de tirosina cinasa

SFB: Suero fetal bovino

STATs: Transductores de señal y activadores de la transcripción

TEM: Transición epitelio-mesénquima

Tyr-397: Tirosina-397

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades en las que una célula se divide sin control, sus descendientes pierden la facultad de anclarse a la matriz extracelular, generan factores que promueven la formación de vasos sanguíneos y adquieren la capacidad de migrar, colonizando otras partes del cuerpo, ocasionando la muerte del individuo.

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia más común dentro de todos los tipos de cáncer diagnosticados en la mujer, representando una incidencia aproximada de 1.4 millones (23%) de casos nuevos en 2008. Las tasas de incidencia varían de una región geográfica a otra, encontrándose las más altas en América del Norte, Australia y Europa Occidental, las de incidencia media en Europa del este y las tasas de incidencia más bajas en América Latina, África y Asia (con excepción de Israel). Esta enfermedad es la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres de todo el mundo, correspondiendo un 14% del total de defunciones (Jemal *et al.*, 2011; Jemal *et al.*, 2010; Center *et al.*, 2011).

En México, en el año 2012, la incidencia tendió al incremento del 14.63% comparado con el 2007, presentándose 23.70 casos por cada 100 mil mujeres mayores de 25 años, siendo la primera causa de muerte en mujeres por tumores malignos desde 2006, superando al cáncer cervicouterino. Los estados que presentan las tasas de mortalidad más altas son: Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Colima y Jalisco; así mismo, con tasas intermedias se encuentran los estados de Hidalgo, Puebla, Sonora, Zacatecas y el Distrito Federal; mientras que los estados del sureste registran las tasas de mortalidad más bajas. En particular, las entidades donde se registra un incremento de cáncer mamario son los estados del norte y el Distrito Federal. Esta distribución heterogénea se ha relacionado con el entorno sociocultural y económico de las regiones, donde los estados del norte tienen ingresos económicos más elevados, teniendo como consecuencia cambios a un estilo de vida parecido al de poblaciones de países más desarrollados. Dentro de estos cambios se incluyen los tipos de dietas que favorecen el sobrepeso y

obesidad, así como otros factores asociados con el desarrollo del cáncer mamario, tales como: nuliparidad, bajos hábitos de lactancia, etc. (de la Vara-Salazar *et al.*, 2011; Palacio-Mejia *et al.*, 2009).

Estructura, función de la glándula mamaria y cáncer de mama

La glándula mamaria está formada por una serie de ductos y lóbulos correspondientes a estructuras tubulares recubiertas de una capa interna de células de epitelio luminal y de una capa externa de células mioepiteliales, rodeadas por una membrana basal (MB) que separa el epitelio del estroma. Esta bicapa está polarizada, el lado apical de las células epiteliales forma el lumen de los ductos y los alveolos; mientras que el lado basal, formado por células mioepiteliales está en contacto con la membrana basal. La función principal de la glándula mamaria es la producción de leche para alimentar y proteger al recién nacido durante los primeros meses de vida. Está sujeta a cambios dramáticos en relación con la forma, tamaño y función, asociados al crecimiento infantil, el embarazo, la lactancia y la involución post-menopáusica. Estos cambios están mediados por los procesos endócrinos y reproductivos, en algunas ocasiones su alteración incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Hansen and Bissell, 2000).

El cáncer de mama se caracteriza por una proliferación descontrolada de las células epiteliales transformadas. La progresión tumoral ocurre a través de una serie de etapas, iniciando con una proliferación epitelial anormal, progresando a carcinoma *in situ* y posteriormente a carcinoma invasivo y metastásico. La metástasis es un proceso complejo, el cual ocurre a través de una serie de etapas secuenciales, que incluye: 1) Migración e invasión de las células tumorales al tejido adyacente, 2) intravasación, 3) transporte y sobrevivencia en el sistema circulatorio (linfático o sanguíneo), 4) extravasación y arresto en un sitio secundario, 5) inicio, mantenimiento del crecimiento y neovascularización del tumor secundario (McPherson *et al.*, 2000; Chambers *et al.*, 2002).

Factores de riesgo

Además del género, existen diversos factores que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama tales como: Genéticos, hormonales, reproductivos y de estilo de vida. Dentro de los factores genéticos se encuentra mutaciones hereditarias en genes BRCA1 y BRCA2 que confieren susceptibilidad al cáncer de mama, historia familiar de cáncer de mama y alta densidad de tejido mamario; hormonales y reproductivos tales como una menarca temprana (antes de los 12 años) y una menopausia tardía (después de los 50 años), nuliparidad, tener el primer hijo después de los 30 años, no amamantar y el uso de terapia hormonal en la menopausia (especialmente la terapia combinada de estrógeno y progestina); factores asociados al estilo de vida tales como sobrepeso u obesidad después de la menopausia, inactividad física y la ingesta de alcohol (McPherson *et al.*, 2000; Society, 2011). Recientemente, se ha asociado al cáncer de mama con la adopción de un estilo de vida “occidentalizado” o de países desarrollados que se caracteriza por una dieta con alto contenido de carbohidratos y grasas que, aunado con una baja actividad física, conlleva a la obesidad y sobrepeso (Gertler and Condeelis, 2011), que se caracteriza por hiperlipidemia e incremento de ácidos grasos libres (AGL) circulantes en la sangre. Por todo lo anterior, recientemente la dieta ha sido destacada entre los factores ambientales de riesgo potenciales, ya que se ha demostrado que la obesidad y factores dietéticos, tales como una mayor ingesta de ácidos grasos, aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Khan *et al.*, 2010; Litton *et al.*, 2008; Murff *et al.*, 2011; Sieri *et al.*, 2008).

Ácidos grasos y cáncer de mama

Los ácidos grasos (AG) se dividen en saturados e insaturados. Los AG insaturados se dividen en monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs), la mayoría de estos últimos, al no poder ser sintetizados por el organismo, se consideran esenciales, por lo tanto deben consumirse en la dieta. Los PUFAs se clasifican metabólicamente en dos familias (Figura 1): omega-3 (ω -3) y omega-6 (ω -6), en base a la posición del primer doble enlace con respecto a la cadena metilo terminal, los PUFAs ω -3 presentan el primer doble enlace en el tercer

átomo de carbono y los PUFAs ω -6 en el carbono 6. Los PUFAs ω -3 son el ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), α -linolénico (ALA) y ácido esteridónico (AS), se encuentran en altas proporciones en aceites de pescado; mientras que los PUFAs ω -6 son el ácido linoleico (AL), ácido araquidónico (AA), docosapentaenoico (DPA) y ácido γ -linolénico (GLA), se encuentran en aceites vegetales y semillas, destacando el AL por su alto contenido en estos productos, además de servir como precursor para la síntesis de otros ácidos grasos. La dieta típica de la población moderna, en especial del hemisferio occidental, tiene una relación de 10:1 de los ω -6 respecto a los ω -3 (Das, 2006). Recientemente, estudios epidemiológicos y en animales han sugerido que los AG exógenos pueden participar en la etiología, evolución y progresión del cáncer de mama; mientras que estudios epidemiológicos han demostrado que tanto la cantidad de grasa y el tipo de AG presentes en la dieta afectan el crecimiento tumoral y la metástasis (Goodstine *et al.*, 2003).

Ácidos grasos omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6)

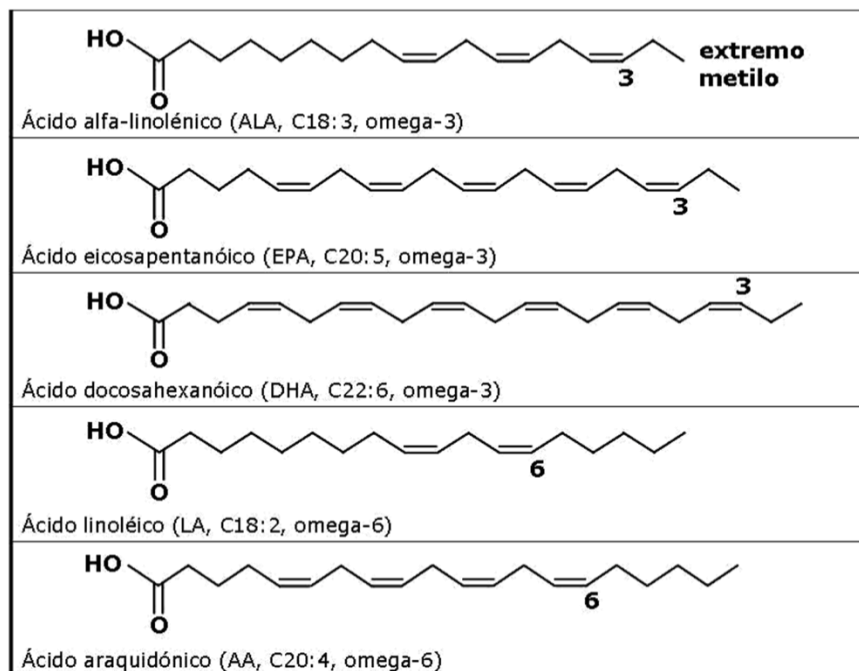


Figura 1. Estructura de PUFAs ω -3 y ω -6.

Los AG libres (AGL) son importantes para el organismo como fuente de energía metabólica, a nivel celular como sustratos para la biogénesis de fosfolípidos de membrana y el almacenamiento de energía metabólica en forma de triglicéridos y ésteres de colesterol. Por otro lado, los AGL pueden actuar como moléculas de señalización regulando directa o indirectamente procesos celulares como: proliferación y desarrollo celular, así como la expresión génica (McArthur *et al.*, 1999). Los AGL se unen y activan a receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), los cuales son mediadores de la transcripción de genes implicados en el metabolismo de lípidos y glucosa (Ferre, 2004). Sin embargo, los AGL también son capaces de mediar diversos procesos biológicos independientes de los PPARs, tales como la proliferación y migración celular. Procesos descritos previamente que están mediados por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Sauer *et al.*, 2000; Yonezawa *et al.*, 2004).

Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los GPCRs son proteínas integrales de membrana que poseen siete dominios transmembranales, que unen ligandos extracelulares activando proteínas G heterotriméricas, regulando procesos celulares como consecuencia de la activación de vías de transducción de señales. Diversos ligandos pueden unirse como agonistas a GPCRs, incluyendo aminas biogénicas, aminoácidos, lípidos, péptidos, proteínas y sustancias odoríferas, lo que conduce a un cambio de conformación y la interacción con proteínas G heterotriméricas. Una vez activados, los GPCRs pueden actuar como factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), induciendo el intercambio de GDP por GTP en las subunidades $G\alpha$ y su disociación de las subunidades $\beta\gamma$. Las subunidades $G\alpha$ están agrupadas en cuatro subfamilias ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$) y complejos $\beta\gamma$ regulan la actividad de proteínas efectoras tales como la adenilato ciclasa, fosfolipasa C (PLC), RhoGEF, PI3K o canales iónicos dependientes de voltaje, generando segundos mensajeros como: AMP cíclico, inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG) o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3) que son capaces de activar otras proteínas río abajo de la cascada de señalización, tales como: La proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) o la proteína cinasa B (Akt). La

activación de los GPCRs conduce a su posterior desensibilización, mediada por cinasas de GPCR (GRKs), que fosforilan al receptor, promoviendo el acoplamiento de la proteína adaptadora arrestina, dando como resultado la internalización del receptor (Liebmann, 2011).

Recientemente, se han identificado cuatro GPCRs para AGL, denominados GPR40 (FFAR1), GPR41 (FFAR3), GPR43 (FFAR2) y GPR120 (FFAR4). GPR40 y GPR120 son activados por AGL de cadena media (8-12 carbonos) y larga (14 carbonos y más) (Briscoe *et al.*, 2003; Hirasawa *et al.*, 2005), mientras que GPR41 y GPR43 son activados por AGL de cadena corta (Brown *et al.*, 2003; Xiong *et al.*, 2004). GPR40 se expresa abundantemente en el páncreas y su activación por AGL de cadena larga incrementa la secreción de insulina estimulada por glucosa (Itoh *et al.*, 2003). GPR120 se expresa abundantemente en el intestino, su activación por AGL de cadena larga promueve la secreción del péptido-1 similar al glucagon (Hirasawa *et al.*, 2005). Así mismo, GPR40 y GPR120 se expresan en células de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y en células epiteliales mamarias no tumorigénicas MCF10A promoviendo procesos de proliferación y migración celular (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Soto-Guzman *et al.*, 2008).

Transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico

Otro tipo de receptores membranales involucrados en el desarrollo del cáncer son los receptores con actividad catalítica intrínseca de tirosina cinasa (RTK). Se han realizado numerosos estudios para dilucidar posibles mecanismos que involucren a estos receptores con los GPCRs. Los RTK contienen un dominio de unión al ligando extracelular, un dominio transmembranal único en forma de hélice alfa, un dominio citosólico con actividad de tirosina cinasa intrínseco y diversos residuos de tirosina. Con excepción del receptor de insulina permanentemente dimerizado, la unión del ligando provoca un cambio conformacional que permite la dimerización de los receptores, activación de sus dominios cinasa y la autofosforilación de sus residuos en tirosina. Estos residuos de tirosina fosforilados sirven como sitios de unión para diversas enzimas (como

PLC γ 1) o proteínas adaptadoras (Grb2 o Shc) que poseen dominios SH2 iniciando la activación de diversas vías de transducción de señales. Las cuatro principales cascadas de señalización desencadenadas por estos receptores incluyen las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la vía PI3K/Akt, la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) y la vía de PLC- γ 1 (Hubbard and Miller, 2007). La activación de los RTKs resulta en la modulación de varias proteínas blanco incluyendo la activación de factores de transcripción.

El RTK mejor caracterizado es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cuya familia comprende cuatro miembros, ErbB1 (HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Estos receptores participan en el control de la proliferación, sobrevivencia y diferenciación celular, siendo su desregulación asociada al desarrollo del cáncer y metástasis. Por otro lado, se ha descrito que diversos ligandos de GPCRs, tales como el ácido lisofosfatídico (LPA), la trombina, la bradiquinina o los agonistas adrenérgicos son capaces de desencadenar señales proliferativas como resultado de la activación de proteínas participantes en las vías de transducción de señales inducidas por los EGFRs, recientemente se ha demostrado que los GPCRs son capaces de utilizar el EGFR como intermediario en su señalización, proceso denominado transactivación. Un mecanismo propuesto para esta transactivación implica la activación de metaloproteasas de matriz (MMP) a través de un mecanismo que involucra a la proteína tirosina cinasa Src y la subsiguiente generación y liberación de ligandos de la familia de factores de crecimiento epidérmico que a su vez activan el EGFR en una forma autócrina/parácrina (Liebmann, 2011). Los GPCRs también pueden inducir la transactivación de EGFR independiente del ligando y MMP, a través de los diferentes miembros de la familia de Src cinasa que pueden fosforilar directamente a tirosinas en la región citoplasmática del EGFR (Drube, *et al.*, 2006), así como por dimerización, donde la interacción directa proteína-proteína de un GPCR y un EGFR puede regular la señalización del EGFR (Watt, *et al.*, 2009). Sin embargo, las vías que conectan distintos GPCRs a EGFRs y la señalización río abajo depende específicamente del contexto celular. De este

modo, los GPCRs son capaces de actuar como potentes reguladores de la proliferación e invasión en células cancerosas.

Fosfolipasa D

Dentro de los efectos modulados por los factores de crecimiento a nivel celular durante los procesos como la migración o proliferación celular es la reorganización del citoesqueleto de actina, siendo la fosfolipasa D (PLD) una enzima clave en estos procesos. La PLD es una enzima que hidroliza lípidos de membrana como la fosfatidilcolina para producir colina y ácido fosfatídico (AP), éste último es un importante mediador en varias vías de señalización asociadas al crecimiento, proliferación y reorganización del citoesqueleto. Esta enzima presenta dos isoformas, la PLD1 y PLD2, codificadas por dos genes diferentes. PLD1 tiene una actividad basal baja y responde principalmente a señales extracelulares; mientras que PLD2 tiene actividad basal alta y es sensible a los activadores de PLD1. Sin embargo, la localización de ambas isoformas se ve alterada cuando son modificadas por fosforilación y palmitoilación. PLD participa en muchos procesos biológicos como proliferación, sobrevivencia, migración celular y tráfico vesicular, siendo su expresión relacionada con la carcinogénesis. Esta enzima puede ser activada por una variedad de mitógenos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la interleucina-1 β (IL-1 β), así mismo su actividad es regulada por la PKC y/o proteínas G pequeñas de la familia de Rho y Arf. Niveles endógenos de AP son bajos en células en reposo, pudiendo variar debido a que la actividad de PLD está fuertemente regulada por mecanismos que controlan la migración, sobrevivencia y proliferación celular. En células de cáncer de mama, la generación de AP tiene un efecto sobre la migración al inducir un incremento de la señalización de la vía Ras-ERK/PI3K-NF κ B, regulación positiva de MMP e inducción de invasión (Exton, 2004; Kang *et al.*, 2011).

Factor de transcripción NF κ B

El factor nuclear κ B (NF κ B) es un factor de transcripción que controla la expresión de más de 500 genes involucrados en diversas respuestas fisiológicas,

la desregulación de la actividad de este factor se asocia al proceso tumoral, puesto que regula la expresión de genes asociados con la migración y degradación de matriz extracelular. NFκB pertenece a la familia de proteínas Rel que incluyen c-Rel, Rel-A (p65), RelB, NFκB1 (p50 y su precursor p105) y NFκB2 (p52 y su precursor p100), formando homo o heterodímeros. Durante el arresto celular, NFκB se mantiene en citoplasma en asociación con la proteína inhibitoria IκB. En la vía clásica de activación, las enzimas IKK fosforilan IκB en dos residuos de serina conservados (Ser 30 y Ser 32), una vez fosforilados, sirven como señal para la ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma 26S, este proceso libera a NFκB permitiendo su translocación al núcleo y su unión al ADN, modulando la transcripción de genes que regulan la inmunidad, comunicación celular, supervivencia, proliferación y su auto-regulación (Gupta *et al.*, 2010; Tafani *et al.*, 2013). En las células de cáncer de mama, la activación de NFκB inducida por factores de crecimiento promueve su unión a la secuencia promotora de PLD1 causando su expresión y promoviendo posteriormente invasión a través de la secreción de MMP (Kang *et al.*, 2011). Por otro lado, en células de epitelio mamario no tumorales MCF10A, el AL induce la transición epitelio-mesénquima (TEM) acompañado por la activación de NFκB (Espinosa-Neira *et al.*, 2011).

Migración celular en cáncer

La migración celular es un evento clave en funciones biológicas, como son la respuesta inmunológica, el desarrollo embrionario o la regeneración de tejidos por células madre. Aún cuando existe una amplia diversidad de tipos celulares, se han podido identificar mecanismos generales conservados que coordinan el movimiento celular así como componentes que se expresan de manera específica en algunos tipos celulares y en condiciones patológicas, tal como la metástasis de células cancerosas. En general, la migración celular puede ser visualizada como un proceso cíclico, la respuesta inicial de una célula a un estímulo migratorio es la polarización y extensión de protusiones en la dirección del estímulo. Estas protusiones pueden ser amplias en forma de láminas llamadas lamelipodias, o punteagudas en forma de espinas, mejor conocidas como filopodias; la formación de estos frentes de migración son dirigidos y mantenidos por la polimerización de

actina cortical y son estabilizados mediante la unión a la MEC o células adyacentes a través de proteínas transmembranales que unen el citoesqueleto, estas adhesiones sirven como sitios de tracción para la migración y continuamente son desensambladas en la parte posterior (Ridley *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2005).

Las células cancerosas migran dentro de los tejidos durante la invasión y metástasis por su propia motilidad, en muchos tumores se observan formas de migración colectiva e individual. En la migración colectiva las células se mueven conjuntamente mediante estructuras laminares, las uniones célula-célula se encuentran presentes, un fenómeno característico durante la angiogénesis y progresión tumoral, donde células de origen epitelial son capaces de migrar individualmente mediante una TEM. Las proteínas de unión a actina regulan el ensamble y desensamble de filamentos de actina, esta dinámica es controlada por una variedad de mecanismos de señalización intracelulares en donde miembros de la subfamilia de proteínas pequeñas de unión a GTP (GTPasas) Rho tienen un papel central en la motilidad de células cancerosas. Las proteínas Rac, Rho y Cdc42 son tres miembros de la familia de GTPasas Rho que actúan como interruptores moleculares que ciclan entre estados de unión a GTP (guanosín trifosfato) y GDP (guanosín difosfato). La forma unida a GTP representa la forma activa de la proteína regulando efectores específicos río abajo para modular la motilidad celular. Específicamente, Rac induce formación de complejos y polimerización de actina durante la formación de lamelipodias; Rho induce la formación de fibras de estrés, mientras que Cdc42 induce la formación de filopodias (Jiang *et al.*, 2009; Price, 2001).

Formación de complejos de adhesión focal

Las células cancerosas presentan cambios específicos en la organización del citoesqueleto, así como en la adhesión, motilidad, regulación del crecimiento y supervivencia. De igual manera, un incremento en la expresión de la cinasa de adhesión focal (FAK) está presente en diversas líneas celulares cancerosas, lo cual correlaciona con un incremento en la motilidad, invasión y proliferación.

El ensamblaje y desensamblaje dinámico de las adhesiones focales juega un papel central en la migración celular; el complejo proteico que se forma en el frente de migración, está constituido por integrinas, proteínas adaptadoras tales como p130Cas, paxilina, talina, y por cinasas como Src y FAK, las cuales permiten el anclaje del citoesqueleto con la MEC. FAK es una proteína cinasa evolutivamente conservada en mamíferos que se expresa en muchos tipos celulares, mediante un dominio en su extremo N-terminal puede localizarse e interaccionar con integrinas y receptores de factores de crecimiento, mientras que su extremo C-terminal es rico en sitios de interacción proteína-proteína, los cuales median la señalización. La activación de FAK está mediada por la autofosforilación en el residuo de tirosina-397 (Tyr-397), lo cual crea un sitio de unión para las cinasas Src, formándose el complejo Src-FAK que media la fosforilación de proteínas involucradas en la regulación dinámica de la migración celular, formando complejos de andamiaje junto a p130Cas durante la formación de contactos focales. El dominio FAT del extremo C-terminal de FAK representa un sitio de unión para la proteína de adhesión focal paxilina. Debido a que paxilina se une directamente a los dominios citoplasmáticos de integrinas así como a la proteína de adhesión focal vinculina, reclutando y focalizando proteínas de andamiaje tales como talina y la propia vinculina durante la formación de contactos focales, esta proteína puede funcionar como un socio de FAK en el acoplamiento de complejos de adhesión. En particular, en los tumores de cáncer de mama, la sobreexpresión de la proteína FAK se correlaciona con un incremento en la migración e invasión de tumores metastásicos (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Navarro-Tito *et al.*, 2010; Parsons, 2003).

ANTECEDENTES

En células de cáncer de mama, se ha demostrado que el ácido oleico promueve proliferación, activación de ERK1/2 y formación de complejos AP1-ADN a través de un mecanismo que involucra a cinasas de la familia Src y la transactivación de EGFR. Aunado a lo anterior, este ácido graso promueve un aumento en la secreción de MMP e invasión a través de una vía dependiente de EGFR, Src y PKC. Por otra parte, el AA promueve activación de FAK y migración en las células de cáncer de mama y un proceso similar a la TEM en células epiteliales mamarias MFC10A. Recientemente se ha determinado que el AL induce procesos de proliferación y migración en células de cáncer de mama, así como un proceso similar a la TEM en células MCF10A.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con más frecuencia en las mujeres alrededor del mundo y constituye la principal causa de muerte por cáncer, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial.

De acuerdo con la evidencia derivada de estudios epidemiológicos y experimentales en modelos animales, existen diversos factores de riesgo para el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Uno de los factores que ha cobrado mucha importancia en los últimos años, es el relacionado con el alto consumo de azúcares y grasas saturadas, el cual es característico de la dieta definida como “occidental”. Este hábito alimenticio conlleva a la obesidad y sobrepeso, que se caracterizan por hiperlipidemias y altas concentraciones de ácidos grasos libres en circulación sanguínea.

Diversos trabajos experimentales han demostrado el papel de los ácidos grasos en procesos clave de la progresión tumoral, como proliferación, evasión de apoptosis, invasión y migración celular. Estos trabajos han demostrado la participación de varias vías de señalización; sin embargo, estudios adicionales son necesarios para entender los mecanismos específicos involucrados en estos eventos, específicamente las vías de transducción de señal desencadenadas por el AL, principal constituyente de los aceites vegetales ampliamente utilizados en las dietas occidentales.

La función de la PLD ha sido implicada en la progresión del cáncer, siendo una enzima clave para regular procesos de migración e invasión a través de diversas vías de señalización. Generalmente, una elevada actividad de PLD correlaciona con la evolución tumoral. Por lo anterior, el presente trabajo se enfoca a dilucidar vías de transducción de señales implicadas en los procesos de migración celular inducidos por AL en células de cáncer de mama, así como el papel de la fosfolipasa D como intermediaria del proceso, la cual es una efectora clave en los procesos tumorales inducidos por EGFRs.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La migración en las células de cáncer de mama inducida por AL es mediada a través de un mecanismo que involucre la actividad de la fosfolipasa D?

HIPÓTESIS

La activación de la fosfolipasa D es un punto clave en la señalización de migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida con AL.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la fosfolipasa D en la migración celular inducida por AL en células cancerosas mamarias.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar el papel de la fosfolipasa D en la migración celular inducida por AL en líneas celulares de cáncer de mama y no tumorales.
- 2) Identificar la isoforma de fosfolipasa D involucrada en la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida con AL.
- 3) Evaluar el efecto del AL sobre la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de contactos focales en células de cáncer de mama MDA-MB-231.
- 4) Determinar la implicación de la fosfolipasa D en la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de contactos focales en células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducidas con AL.
- 5) Comparar el efecto del AL sobre la activación del factor de transcripción NFκB en células de cáncer de mama con diferente capacidad metastásica o invasiva.
- 6) Evaluar la participación de la fosfolipasa D en la activación del factor de transcripción NFκB en células de cáncer de mama MDA-MB-231 estimuladas con AL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

El estímulo celular se preparó a partir de la solución stock de ácido linoleico (Sigma Aldrich, Cat. L8134), en alícuotas a una concentración de 90 mM utilizando como diluyente metanol, las alícuotas fueron almacenadas a -20 °C. Los inhibidores VU0155069 (Santa Cruz Biotech, Cat. 1130067-06-9) y halopemida (Sigma Aldrich, Cat. 59831-65-1) fueron diluidos en DMSO en alícuotas de 10 mM y 310 µM, respectivamente, almacenados a -20 °C. Las concentraciones finales de los estímulos se prepararon en medio de cultivo el mismo día de la aplicación. Se utilizó el anticuerpo anti-Paxilina (Transduction Laboratories, Cat. 610051), Faloidina rodaminada (Sigma Aldrich, Cat. P1951) y anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC (ZYMED Laboratories, Cat. 81-6511). Para ensayos de migración se utilizó Mitomicina C previamente diluida en medio de cultivo y almacenada a 4 °C (Sigma Aldrich, Cat. 50-07-7).

Cultivos celulares

Las células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron mantenidos en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 5% de suero fetal bovino (SFB), Anfotericina B y antibióticos en una atmósfera que contenía 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa a 37 °C. Las células MCF10A fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (3:1) suplementado con 5% de SFB, 1 µg/mL de insulina, 0.5 µg/mL de hidrocortisona, 10 µg/mL de EGF recombinante y antibióticos, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa a 37°C. Finalmente, las células MCF12A fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (1:1) suplementado con 10% de SFB, 1 µg/mL de insulina, 0.5 µg/mL de hidrocortisona, 10 µg/mL de EGF recombinante y 9 ng/mL de toxina del cólera como agente de crecimiento, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa a 37°C.

Estimulación de células

Para la realización de los experimentos, las líneas celulares de cáncer mamario se incubaron en ausencia de suero por 24 horas. Las células MCF10A y MCF12A en confluencia se incubaron en ausencia de suero durante 6 horas. Posteriormente fueron tratadas con 90 μM de AL y/o inhibidores de la fosfolipasa D (VU0155069 10 μM o Halopemida 310 nM), la estimulación se terminó aspirando el medio.

Preparación de extractos nucleares para EMSA

Los cultivos de células MDA-MB-231 estimulados y sin estimular fueron lisados con detergente no-iónico Nonidet P40 0.1% en buffer A frío (Tris-HCL 10 mM pH 7.4, NaCl 10 mM, MgCl_2 6 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM). Los lisados fueron centrifugados a 1600 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante que representa los extractos citosólicos se desechó, mientras que el precipitado, constituido por los núcleos celulares, fue lisado y resuspendido en buffer B frío (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 420 mM, glicerol 20%, MgCl_2 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Na_3VO_4 1 mM, NaF 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM). Los extractos nucleares fueron recuperados por centrifugación a 14000 rpm por 15 min a 4 °C. Las proteínas fueron cuantificadas usando reactivo Bradford (BioRad).

Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Como sonda se usaron oligonucleótidos de doble cadena con sitios específicos para NF κ B (5'-AGCTAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGG-3'). Se marcaron 20 pmol del oligonucleótido con [γ - ^{32}P]ATP usando la enzima polinucleótido cinasa T4. El oligonucleótido marcado con ^{32}P fue incubado con 7 μg de extracto nuclear en una mezcla de reacción que contenía 3 μg poli (dl-dC), HEPES 0.25 mM pH 7.5, KCl 0.6 M, MgCl_2 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 7.5 mM, glicerol 9% durante 20 min a 4 °C. Un exceso de cien veces de oligonucleótidos sin marcar con sitios específicos para NF κ B y oligonucleótido irrelevante fueron usados como competidores específico y no-específico, respectivamente. Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 6% en buffer TBE 0.5x, finalmente el gel se secó y fue analizado por autorradiografía.

Ensayo de migración mediante cierre de herida o *scratch*

Estos ensayos se realizaron en cajas Petri de 30 mm de diámetro a 100% de confluencia celular. Los cultivos celulares se mantuvieron en ayuno de suero por tiempos determinados para cada línea celular; para inhibir la proliferación celular se realizó un pretratamiento con mitomicina C por 2 horas. Posteriormente se realizó la ralladura utilizando una punta de pipeta estéril, se retiró el exceso de células del medio mediante lavados con PBS. Para evaluar el proceso de migración celular se realizó estímulos con AL. Para evaluar la participación de la enzima PLD de interés se utilizaron inhibidores específico de la isoforma D1 (VU0155069) y D2 (Halopemida). Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con paraformaldehído 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Enseguida se lavaron dos veces con PBS, fueron teñidas con cristal violeta 0.1% por 5 min, se lavaron tres veces con agua bidestilada y fueron fotografiadas en un microscopio invertido con un objetivo de 40X y el análisis densitométrico se realizó mediante el programa libre *ImageJ 1.47v* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Ensayo de migración en cámaras de Boyden

El ensayo de migración fue realizado en cámaras transwell de 24 pozos con poro de 8 μm de diámetro. Brevemente, se colocaron 1×10^5 células en el compartimento superior de la cámara en medio DMEM libre de suero. En el compartimento inferior de la cámara se colocaron 500 μL de medio con las diferentes condiciones de estímulo. Las células fueron incubadas a 37 °C por 48 h. Después de la incubación se retiró el medio de los dos compartimentos, las células fueron fijadas con metanol frío y con un isopo se retiró el exceso de células en la parte superior de la membrana. Las células que migraron hacia la parte inferior de la membrana fueron teñidas con cristal violeta al 0.1% y cuantificadas por absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Los datos son expresados en la gráfica como veces de migración sobre los valores del control (células sin estímulo).

Inmunofluorescencia

La localización subcelular de paxilina en los contactos focales se realizó con inmunofluorescencia para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Células MDA-MB-231 fueron crecidas hasta un 70% de confluencia sobre cubreobjetos, posteriormente se ayunó por 24 hr y estimuladas con las condiciones correspondientes. Los cubreobjetos se lavaron con PBS y las células se fijaron con paraformaldehído 4% y posteriormente se permeabilizaron con tritón 0.5%. Las células se lavaron con PBS y se bloquearon con buffer PBS-BSA 1% durante 20 min. Los cubreobjetos se incubaron con un anticuerpo anti-paxilina en cámara húmeda por 24 hr a 4 °C, posteriormente, se realizaron lavados con PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC y con faloidina rodaminada por 2 hr a 4 °C. Para el montaje de los cubreobjetos, se lavaron con PBS y se utilizó VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc, Cat. H-1000) como medio de montaje. Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal con un objetivo de 63X y se analizaron en el software *LAS AF Lite 2.6* (Leica Microsystems, 2011).

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software, Inc., 2007). Las pruebas que se realizaron fueron ANOVA de una vía comparada mediante la prueba múltiple de Dunnett y Newman-Keuls y se determinó la significancia estadística de al menos 3 experimentos independientes de acuerdo a los valores de $p < 0.05$ y los resultados se presentan como el promedio \pm la desviación estándar (SD).

RESULTADOS

La migración celular inducida por AL es dependiente de la actividad de la PLD

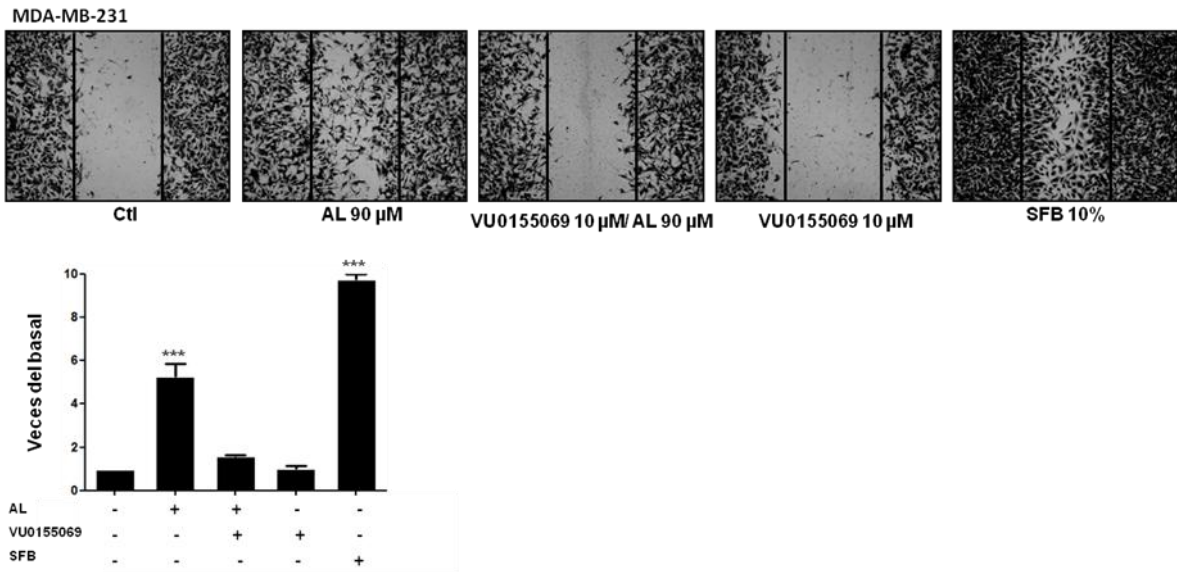
La PLD es una enzima importante de señalización implicada en el control de muchos procesos biológicos, incluyendo la migración celular. En comparación con los tejidos no tumorales, una elevada expresión y actividad de PLD se ha detectado en diversos tumores cancerígenos, incluyendo los de mama. Por otra parte, previamente se ha establecido que el AL induce migración celular en la línea celular de cáncer mamario metastásico MDA-MB-231 (Serna-Marquez *et al.*, 2012). Por esta razón se analizó la participación de PLD en la migración de células cancerosas mamarias inducida por AL.

Para determinar la participación de PLD en la migración celular mediada por AL, se realizaron ensayos de cierre de herida o “scratch” en células de cáncer de mama metastásicas MDA-MB-231 y en células MCF-7 de cáncer de mama no invasivas. Como controles se usaron dos líneas celulares de epitelio mamario no tumoral MCF10A y MCF12A. Cultivos confluentes fueron ayunados durante 24 h para las líneas celulares de cáncer de mama y 6 horas para las líneas no tumorales. Posteriormente, fueron tratadas con 90 μ M AL solo o en combinación con VU0155069 10 μ M o halopemida 310 nM, inhibidores específicos de PLD1 y PLD2, respectivamente (Scott *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2011; Monovich *et al.*, 2007). Como control positivo de la migración celular se utilizó suero fetal bovino (SFB) al 5%. Posteriormente, los cultivos celulares fueron incubados con los estímulos correspondientes por 48 h. El grupo de trabajo ha reportado previamente, las concentraciones máximas del AL a las cuales alcanza un efecto biológico (Serna-Marquez *et al.*, 2012). De manera similar a lo reportado anteriormente, el AL induce migración celular en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF10A. Sin embargo, de manera interesante, el tratamiento con VU0155069 inhibió significativamente la migración celular (Figuras 2A y 5). En contraste, la incubación con el inhidor de PLD2 halopemida no tiene ningún efecto sobre la migración inducida por AL en células MDA-MB-231 (Figura 3). Por otro lado, el AL

no induce migración celular en células MCF-7, una línea celular de cáncer de mama no invasiva, tampoco en las células MCF12A no tumorales (Figuras 4 y 6).

Debido a la participación de la PLD1 en la migración de células de cáncer de mama invasivas inducida por AL, se usó como modelo para los ensayos posteriores las células MDA-MB-231. Para evaluar cuantitativamente la migración en células MDA-MB-231 se realizaron ensayos de migración utilizando el método de cámara de Boyden. Al término de las 48 h de incubación con el estímulo, el AL provocó un efecto de quimioatracción e indujo migración celular. Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas en combinación con VU0155069 se inhibió de manera significativa dicho efecto; como control positivo se utilizó un estímulo con SFB 5% (Figura 2B).

A)



B)

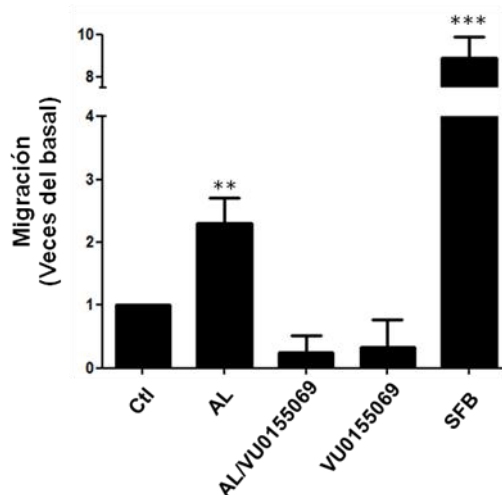


Figura 2. El AL induce migración celular a través de un mecanismo dependiente de PLD1 en células de cáncer de mama metastásicas. (A) Las células MDA-MB-231 fueron crecidas hasta una confluencia de 100% en cajas Petri de 35 mm de diámetro y pretratadas con 12 μM de mitomicina C por 2 h. Posteriormente se realizó una ralladura con puntas de micropipeta de 200 μL y fueron estimuladas con 90 μM de AL con o sin VU0155069 10 μM durante 48 h. Pasado el tiempo de estímulo, las células fueron fijadas y teñidas como se refiere en metodología y se tomaron fotografías de la ralladura, se analizó el porcentaje de área cerrada con el programa libre *ImageJ 1.47v*. (B) Ensayo de migración en cámara de Boyden. En cámara de Boyden se colocaron 1×10^5 células en cada pozo, en la parte inferior de las membranas se colocaron los estímulos de 90 μM de AL solo o en combinación con VU0155069 10 μM por un tiempo de 48 h, posteriormente las células que migraron hacia la parte inferior de la membrana fueron fijadas y teñidas para su cuantificación en un espectrofotómetro. Las gráficas representan el promedio \pm SD de las áreas cerradas de las heridas y de células que migraron en cámara de Boyden en los ensayos de migración de al menos tres experimentos independientes y son expresados como veces de migración con respecto al basal (células no estimuladas). Significancia estadística ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

MDA-MB-231

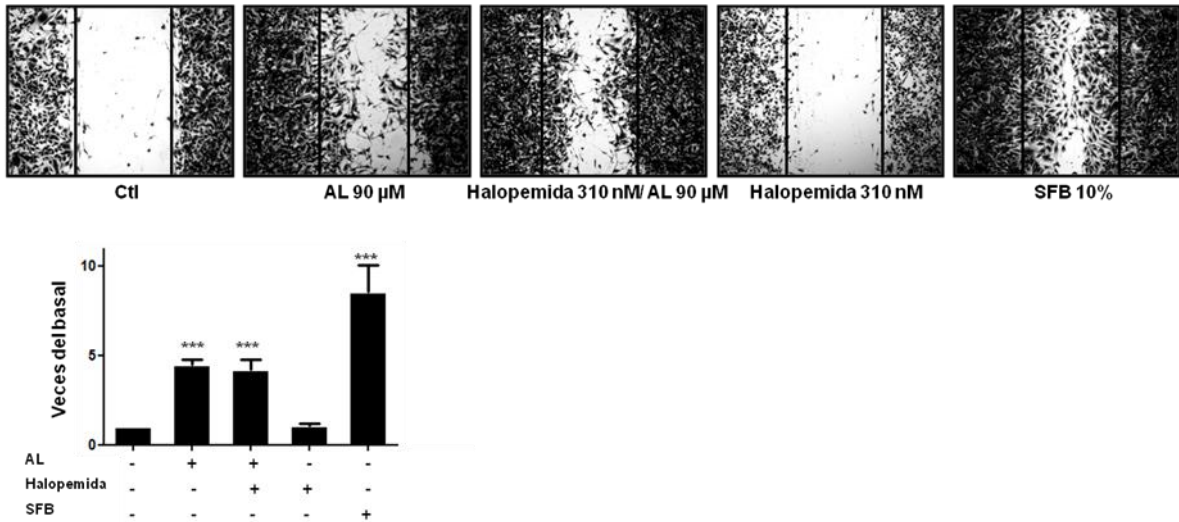


Figura 3. PLD2 no participa en la migración celular inducida por AL en células de cáncer de mama metastásicas. Las células MDA-MB-231 fueron crecidas hasta una confluencia de 100% en cajas Petri de 35 mm de diámetro y pretratadas con 12 µM de mitomicina C por 2 h. Posteriormente se realizó una ralladura con puntas de micropipeta de 200 µL y estimuladas con 90 µM de AL con o sin halopemida 310 nM durante 48 h. Pasado el tiempo de estímulo, las células fueron fijadas y teñidas como se refiere en metodología y se tomaron fotografías de la ralladura, se analizó el porcentaje de área cerrada con el programa libre *ImageJ 1.47v*. La gráfica representa el promedio +/- SD de al menos tres experimentos independientes y son expresados como incremento del basal (células no estimuladas). Significancia estadística *** p<0.001 mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

MCF7

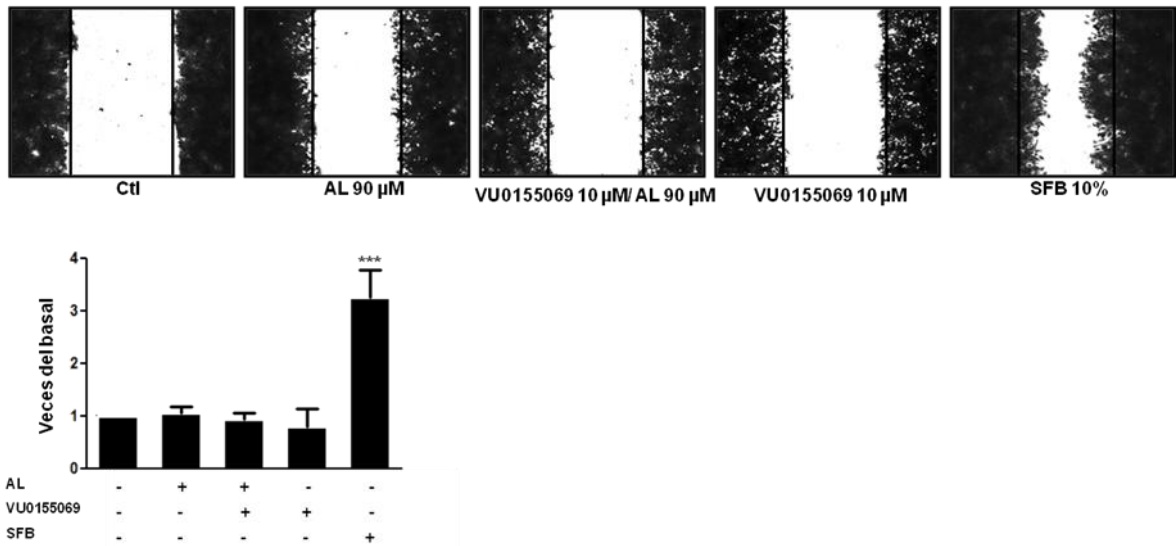


Figura 4. AL no induce migración celular en células de cáncer de mama no metastásicas. Las células MCF-7 fueron crecidas hasta confluencia en cajas Petri de 35 mm de diámetro y pretratadas con 12 µM de mitomicina C por 2 h. Posteriormente se realizó una ralladura con puntas de micropipeta de 200 µL. Las células fueron incubadas por 48 h con 90 µM de AL solo o en combinación con VU0155069 10 µM. Las fotografías fueron tomadas a las 48 horas después de la ralladura. La gráfica representa el promedio +/- SD de al menos tres experimentos independientes y son expresados como incremento del basal (células no estimuladas). Significancia estadística *** p<0.001 mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

MCF-10A

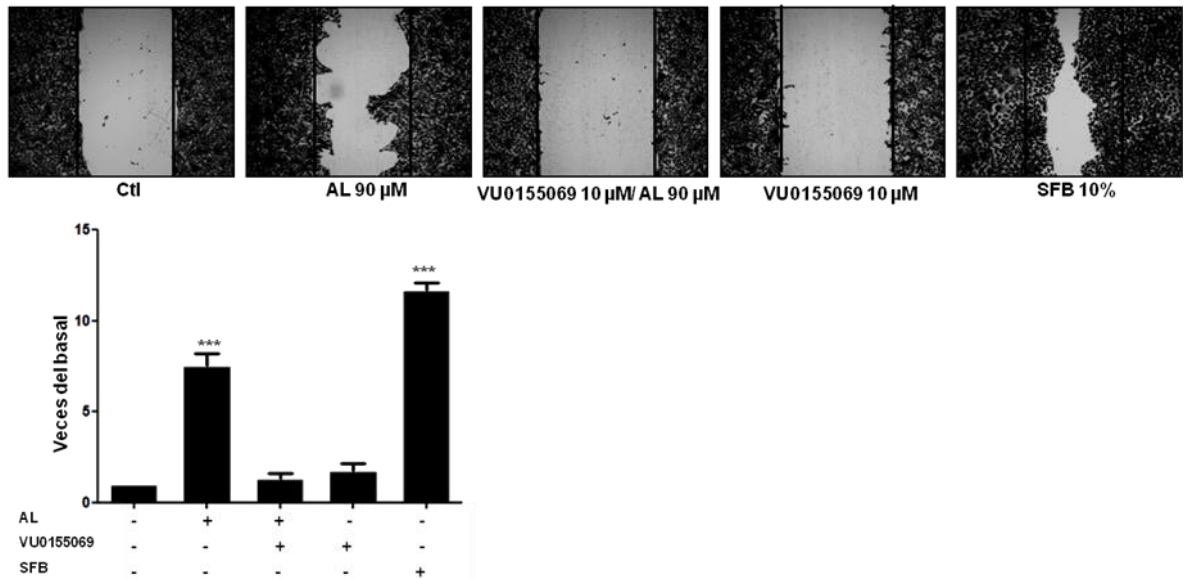


Figura 5. AL induce migración celular a través de un mecanismo dependiente de la PLD1 en células de epitelio mamario no tumorales MCF10A. Las células MCF10A fueron crecidas hasta confluencia en cajas Petri de 35 mm de diámetro y pretratadas con 12 µM de mitomicina C por 2 h. Posteriormente se realizó una ralladura con puntas de micropipeta de 200 µL. Las células fueron incubadas por 48 h con 90 µM de AL solo o en combinación con VU0155069 10 µM. Las fotografías fueron tomadas a las 48 h después del estímulo. La gráfica representa el promedio +/- SD de al menos tres experimentos independientes y son expresados como incremento del basal (células no estimuladas). Significancia estadística *** $p < 0.001$ mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

MCF-12A

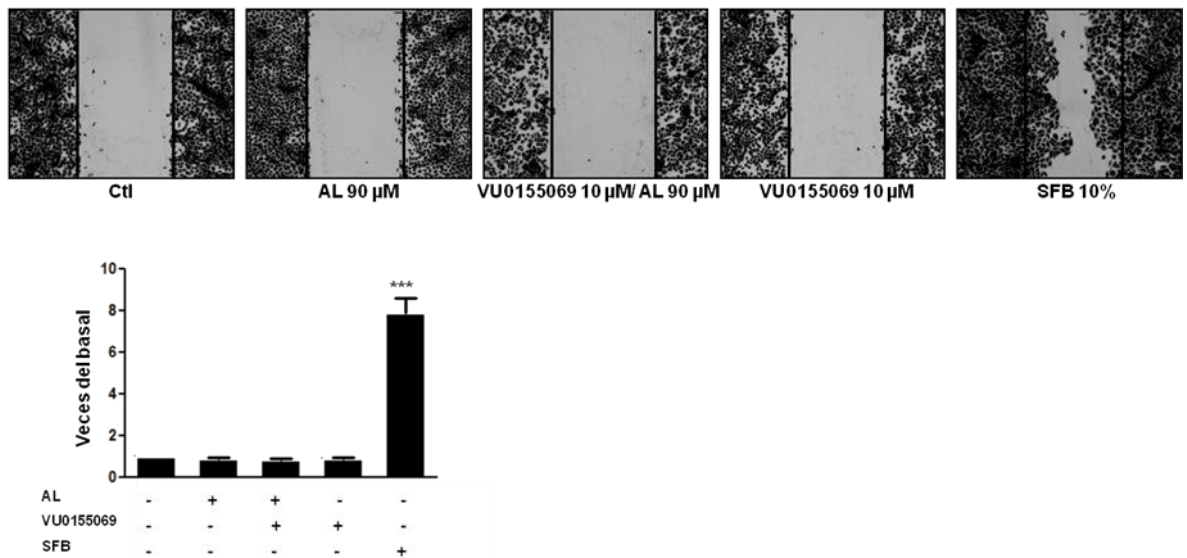


Figura 6. AL no induce migración celular en células de epitelio mamario no tumorales MCF12A. Las células MCF12A fueron crecidas hasta confluencia en cajas Petri de 35 mm de diámetro y pretratadas con 12 µM de mitomicina C por 2 h. Posteriormente se realizó una ralladura con puntas de micropipeta de 200 µL. Las células fueron incubadas por 48 h con

90 μM de AL solo o en combinación con VU0155069 10 μM . Las fotografías fueron tomadas a las 48 horas después del estímulo. La gráfica representa el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes y son expresados como incremento del basal (células no estimuladas). Significancia estadística *** $p < 0.001$ mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

AL induce la formación de contactos focales durante la migración celular en células de cáncer de mama.

Para cumplir con nuestro siguiente objetivo, se evaluó la formación de contactos focales. Durante la migración celular se requiere el ensamblaje y desensamblaje continuo del citoesqueleto de actina hacia la MEC para que la célula pueda desplazarse. Para ello, se analizó, por microscopía confocal, la formación de contactos focales utilizando anticuerpos anti-paxilina acoplado a FITC y faloidina acoplado con rodamina. Células MDA-MB-231 fueron estimuladas por 1 h con 90 μM de AL solo o en combinación con VU0155069 10 μM o halopemida 310 nM, inhibidores de PLD1 y PLD2, respectivamente. El tratamiento con AL induce un incremento y orientación de contactos focales hacia el frente de migración, así como un efecto de extensión celular hacia la MEC respecto al control (Figuras 7A y 7B), dicho efecto fue abatido ante el tratamiento con VU0155069 o halopemida, observándose un mayor efecto inhibitorio con el inhibidor de PLD1 (Figuras 7C y 7E).

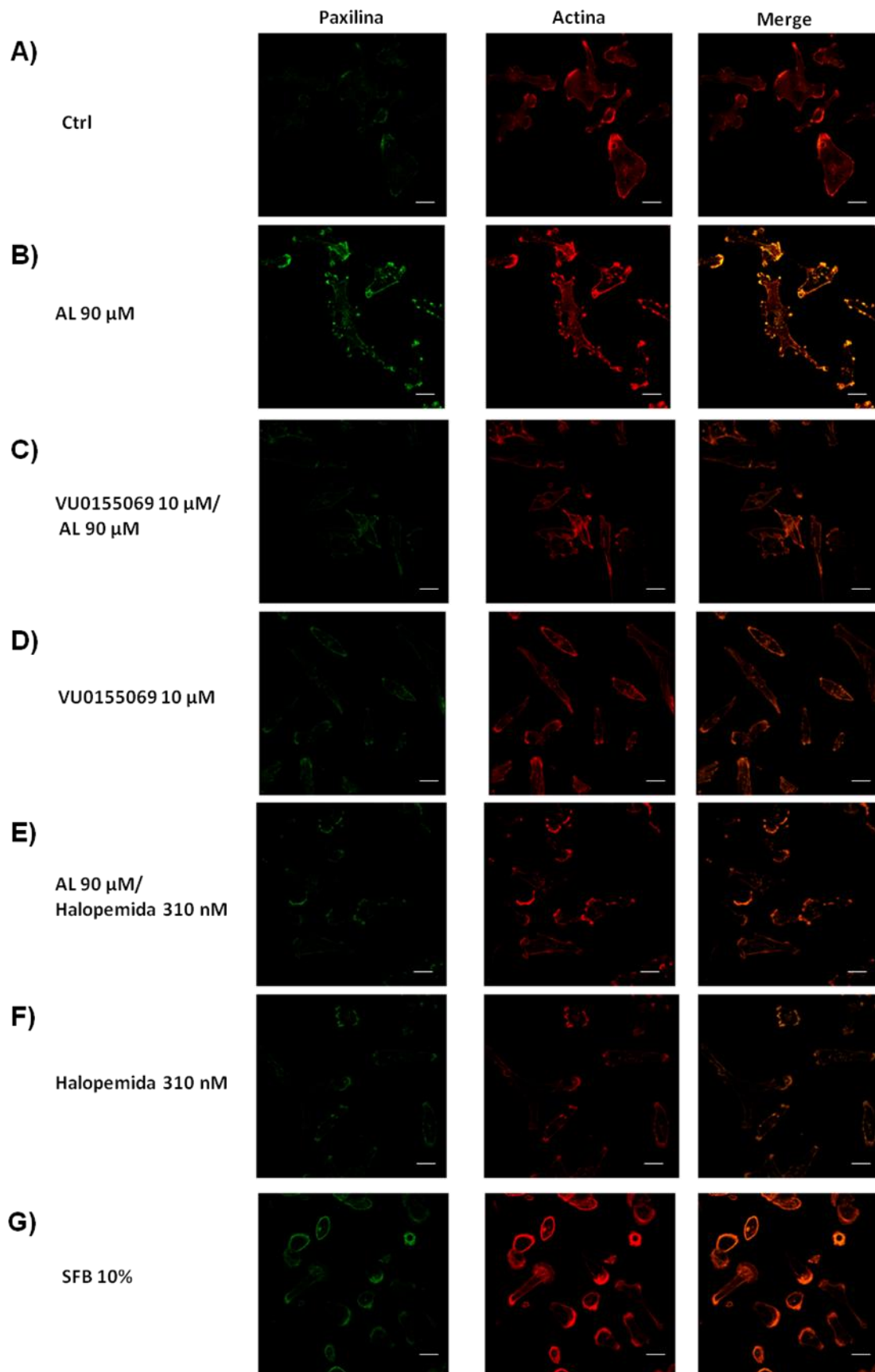


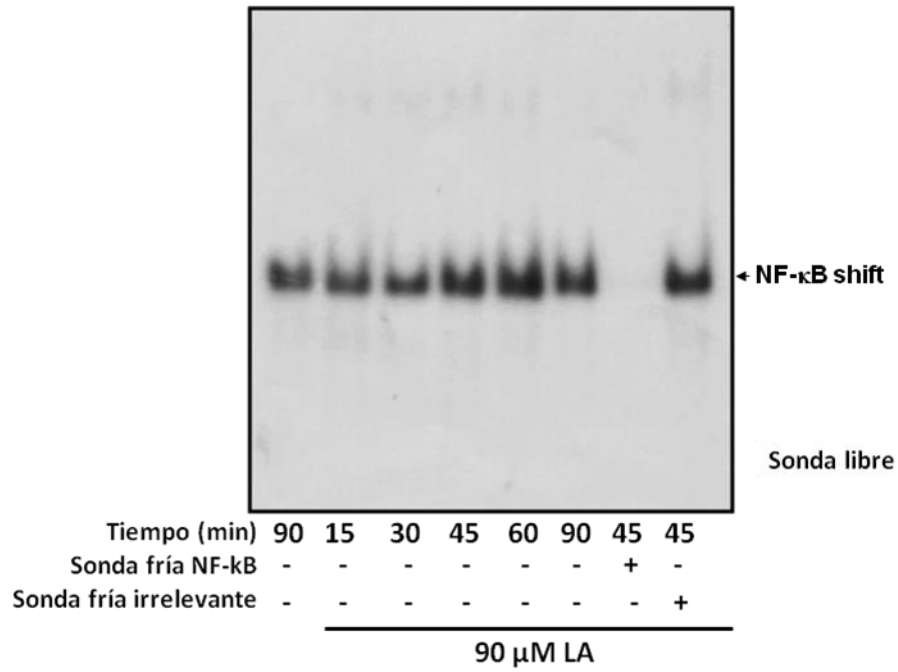
Figura 7. AL regula la formación de contactos focales en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 fueron crecidas en cubreobjetos de vidrio, privadas de SFB por 14 h y estimuladas con 90 μ M de AL solo o con inhibidores de PLD (VU0155069 10 μ M, halopemida 310 nM) por 15 minutos. Las células fueron fijadas y teñidas para microscopía utilizando anticuerpos anti-paxilina acoplado a FITC (color verde) y faloidina rodaminada (color rojo) para teñir actina. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal con un aumento de 63X y son representativas de dos experimentos independientes. La barra de escala indica 5 μ m.

AL promueve la unión al ADN del factor de transcripción NF κ B a través de una vía independiente de PLD en células MDA-MB-231

El factor de transcripción NF κ B juega un papel principal durante la oncogénesis, normalmente se encuentra activo en diversos tipos de cáncer incluido el cáncer de mama, debido a esto, decidimos evaluar el efecto que tiene el estímulo con AL sobre la actividad de NF κ B en células de cáncer de mama. Células MDA-MB-231 fueron estimuladas con 90 μ M de AL a diferentes tiempos y las fracciones nucleares fueron obtenidas como se describe previamente (Espinosa-Neira *et al.*, 2011). La activación de NF κ B fue analizada por EMSA usando extractos nucleares y una sonda de oligonucleótidos marcada radiactivamente que representa un sitio canónico de unión a NF κ B. Los resultados obtenidos muestran que el AL induce la formación de complejos NF κ B-ADN de manera dependiente del tiempo alcanzando un máximo de activación a los 60 minutos (Figura 8A). Posteriormente se determinó el efecto que tiene la inhibición de la actividad de la PLD1 y PLD2 en la activación de NF κ B inducida por AL. No obstante, el tratamiento combinado con VU0155069 10 μ M o halopemida 310 nM no tiene ningún efecto sobre la unión al ADN de NF κ B inducida por AL (Figura 8B).

A)

MDA-MB-231



B)

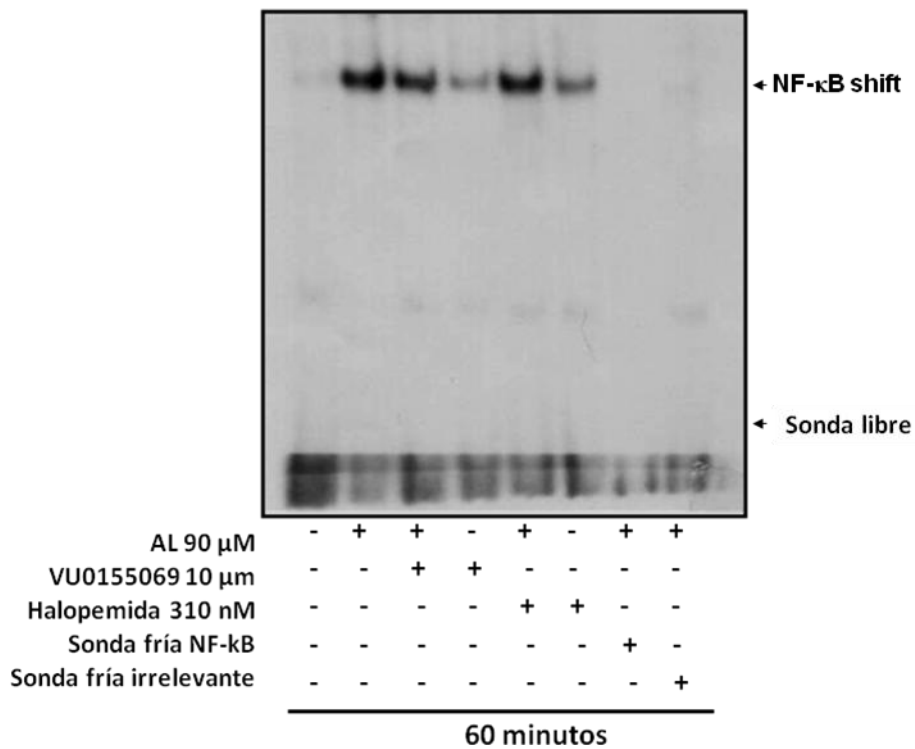


Figura 8. AL induce formación de complejos NFκB-ADN de manera dependiente del tiempo a través de un mecanismo independiente de la PLD. (A) Extractos nucleares fueron obtenidos a partir de células MDA-MB-231 tratadas con 90 μM de AL por varios tiempos. (B) Extractos nucleares fueron obtenidos a partir de células MDA-MB-231 estimuladas por 60 min con 90 μM de AL sólo o con inhibidores. La actividad de unión al ADN de NFκB fue analizada por EMSA. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Posteriormente se analizó el efecto que tiene el AL sobre la activación de NFκB en células de cáncer no metastásicas. Para tal efecto, células MCF-7 fueron estimuladas con AL 90 μM a diferentes tiempos y se obtuvieron fracciones nucleares, los cuales fueron analizados por EMSA. El AL es capaz de inducir la formación de complejos NFκB-ADN en una manera dependiente del tiempo, induciendo la activación de este factor a los 15 y 30 minutos, disminuyendo a niveles basales al término de 1 h de estimulación (Figura 9).

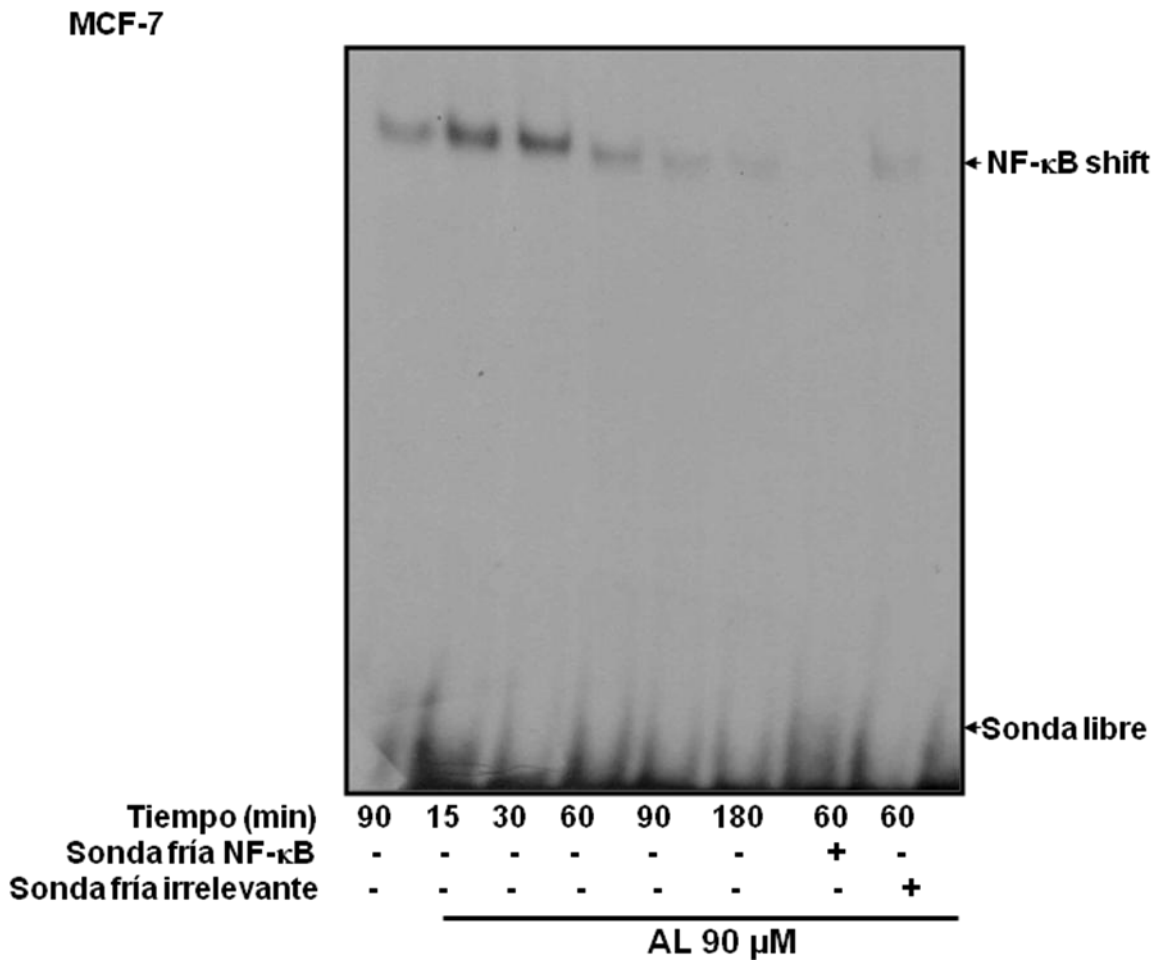


Figura 9. AL induce formación de complejos NFκB-ADN de manera dependiente del tiempo en células MCF-7. Extractos nucleares fueron obtenidos a partir de células MCF-7 tratadas con 90 μM de AL a diferentes tiempos. La actividad de unión al ADN de NFκB fue analizada por EMSA.

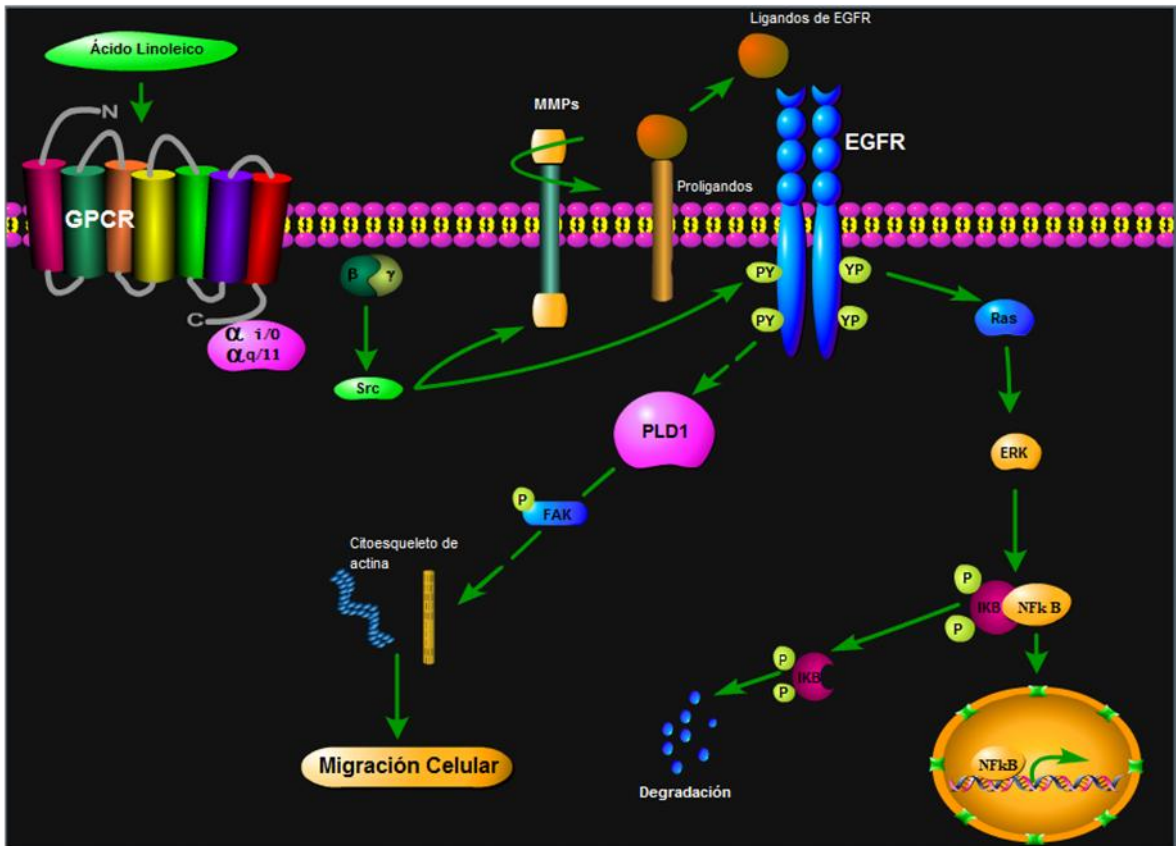


Figura 10. Posible mecanismo por el cual el AL induce sus efectos en células MDA-MB-231. El esquema representa posibles mecanismos desencadenados por el AL para inducir migración en células MDA-MB-231 a través de una vía que implica la activación de la PLD1, también se representa la posible vía de señalización por la cual el AL induce la activación de NFκB.

DISCUSIÓN

En los últimos años, el cáncer de mama se ha incrementado de manera notable alrededor del mundo y en mayor grado en países occidentales. Los carcinomas ductales son los tipos más prevalente de cáncer de mama, representando más del 90% de casos (Jemal *et al.*, 2010). El desarrollo de este tipo de cáncer requiere de múltiples etapas que ocurren a lo largo de años: estos eventos se caracterizan por una proliferación descontrolada de células malignas generando carcinoma ductal *in situ*, el cual secuencialmente adquiere la capacidad de degradar membrana basal invadiendo tejido circundante, para finalmente diseminarse a través del torrente sanguíneo, colonizando sitios distantes del organismo. La adquisición de la capacidad migratoria de las células cancerosas es una propiedad fundamental durante la evolución tumoral, específicamente durante los eventos de angiogénesis y metástasis.

Existen múltiples factores de riesgo bien establecidos para el desarrollo de cáncer de mama. Diversos estudios han demostrado que determinados tipos de dietas caracterizadas por alto contenido de grasas, incluyendo AG saturados, MUFAs, PUFAs ω -3 y ω -6, están asociadas con un incremento de riesgo al cáncer de mama (Lee *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2008). El AL es el principal PUFA ω -6 en dietas de países occidentales y ha sido vinculado al desarrollo de cáncer en modelos animales, así como a la inducción de un proceso similar a la TEM en células no tumorales MCF10A (Fay *et al.*, 1997; Espinosa-Neira *et al.*, 2011). De manera más específica, se ha reportado que el AL puede contribuir a la progresión tumoral induciendo migración en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Serna-Marquez *et al.*, 2012), sin embargo, los mecanismos celulares desencadenados por el AL no están bien establecidos.

Una enzima asociada a la progresión del cáncer es la PLD, su actividad genera AP, el cual es un lípido intracelular que actúa como segundo mensajero. En respuesta a señales mitogénicas y oncogénicas, diferentes vías de señalización efectoras del AP que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina durante la motilidad, migración e invasión, pasos críticos en la progresión del

cáncer han sido propuestas. Por ejemplo, en células de carcinoma de ovario humano OVCAR-3, PLD1 y AP inducen migración y formación de lamelipodias a través de la GTPasa Rac (Chae *et al.*, 2008). Por otro lado, en células MDA-MB-231 estimuladas con EGF, PLD1 regula migración e invasión celular a través de la vía Ras-ERK/PI3K (Kang *et al.*, 2011), así mismo, un aumento en la actividad de PLD incrementa la capacidad para migrar e invadir matrigel en dicha línea celular (Zheng *et al.*, 2006). En el presente trabajo demostramos que el tratamiento previo con VU0155069, un inhibidor selectivo de la PLD1 (Scott *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2011), abate la migración inducida por AL en células cancerosas MDA-MB-231 (Figura 2). Sugiriendo que el AL induce migración a través de un mecanismo mediado por la PLD1.

La TEM es un proceso biológico implicado en la invasión y metástasis, en el cual las células epiteliales pierden la polaridad ápico-basal, la capacidad de formar uniones célula-célula y esto es acompañado por la adquisición de características mesenquimales donde las células sufren cambios en su citoesqueleto y adquieren la capacidad de degradar membrana basal y de migrar. Un reporte previo de nuestro laboratorio muestra que el AL induce TEM y migración en células de epitelio mamario no tumoral MCF10A (Espinosa-Neira *et al.*, 2011), en base a nuestros resultados, demostramos que dicha migración inducida por AL es dependiente de PLD1 (Figura 5).

Una etapa esencial en el proceso metastásico es la migración de células tumorales, y las adhesiones focales juegan un papel importante en su regulación. Una molécula asociada a la señalización de integrinas en las adhesiones focales es paxilina, la cual, una vez fosforilada, funciona como una proteína adaptadora para reclutar proteínas de señalización y del citoesqueleto durante la extensión, formación de protusiones y motilidad celular. Entre otros factores, ligandos para GPCRs y RTKs han sido reportados que estimulan la fosforilación de paxilina (Schaller, 2001). Dado que los AGL de cadena media y larga, entre los que se encuentra el AL, pueden actuar a través de GPCRs (Briscoe *et al.*, 2003; Hirasawa *et al.*, 2005), se decidió estudiar el efecto del AL sobre la formación de adhesiones focales. Utilizando un anticuerpo marcado con FITC, se analizó el

comportamiento de paxilina durante este proceso. En apoyo a esta hipótesis, previamente se reportó que AG como el AL, AA y el AO inducen la activación de FAK, una proteína asociada a las adhesiones focales durante la extensión y migración celular en la tumorigénesis (Serna-Marquez *et al.*, 2012; Navarro-Tito *et al.*, 2008; Navarro-Tito *et al.*, 2010). El estímulo con AL por 1 h en células MDA-MB-231 indujo un cambio morfológico formando protrusiones celulares, así como un incremento notable de contactos focales localizados hacia la parte frontal de células en migración (Figura 7). Paxilina es una proteína adaptadora y de andamiaje que media el ensamblaje y recambio de contactos focales en la migración, diversos factores extracelulares son capaces de inducir fosforilación de residuos de tirosina en dicha proteína, siendo FAK la principal enzima para llevar a cabo su fosforilación en los residuos de tirosinas 31 y 118, sitios de unión para moléculas de señalización y de andamiaje. Bajo este contexto, en células MDA-MB-231 se ha reportado que la actividad de PLD regula la formación de complejos FAK-paxilina a través de la vía MAPK-ERK para inducir motilidad (Pribic and Brazill, 2012). Tomando en cuenta esta relación directa entre la actividad de PLD y las adhesiones focales, nuestros resultados indican que el efecto del AL sobre la formación de los contactos focales en células MDA-MB-231 fue abatido cuando las células fueron incubadas previamente con el inhibidor de PDL1 VU0155069. Sin embargo, el uso de halopemida, inhibidor específico de la PLD2, no tiene un efecto inhibitorio significativo sobre los cambios inducidos por el AL (Figura 7), el cual es un resultado esperado debido a que PLD1 es la isoforma que generalmente responde a señales extracelulares. Este resultado apoya la idea de que en cultivos de fibroblastos, Rho regula la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, donde la actividad de PLD1 es un punto clave en la reorganización del citoesqueleto de actina, a diferencia de la PLD2 que se asocia solo a la regulación de actina cortical y formación de filopodias (Kam and Exton, 2001). En conjunto, estos resultados indican que el AL induce un cambio morfológico, así como un recambio dinámico de las adhesiones focales para promover migración en células de cáncer de mama a través de un mecanismo que implica la activación de la PLD1.

Por otro lado, NF κ B es un factor de transcripción capaz de regular genes involucrados en la inflamación, ciclo celular, invasión, metástasis, angiogénesis y anti-apoptosis; su activación es esencial en etapas tempranas en la transformación carcinogénica de células epiteliales (Kim *et al.*, 2000), sin embargo, en el cáncer de mama no está bien establecido si los ácidos grasos presentes en la dieta pueden contribuir al incremento de su actividad durante el desarrollo tumoral. Dado esto, evaluamos el efecto que tiene el AL sobre la activación de este factor de transcripción en células de cáncer de mama metastásicas. En primera instancia, corroboramos los niveles basales de activación de NF κ B, lo cual concuerda con reportes previos acerca de una activación constitutiva de este factor en cáncer de mama (Bath-Nakshatri *et al.*, 2002), sin embargo, nuestros datos indican que el AL incrementa de manera notable la activación de NF κ B tiempo dependiente en células de cáncer de mama metastásicas (Figura 8A), y además, determinamos que dicho efecto es a través de una vía de señalización independiente de PLD1 y PLD2 (Figura 8B).

Un alto contenido de PUFAs ω -6 con respecto a los PUFAs ω -3 es encontrado en “dietas occidentales” de países desarrollados y que paulatinamente son adquiridas por países en desarrollo. Tomando en cuenta que células de mamífero no pueden convertir PUFAs ω -6 a PUFAs ω -3, debido a que carecen de la enzima convertidora desaturasa ω -3, estudios epidemiológicos y a nivel molecular demuestran que estos cambios dietarios promueven el desarrollo de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer (Simopoulos, 2006). AGL de cadena media y larga pueden ejercer sus efectos a través de los GPCRs GPR40 y GPR120, además, en cultivos celulares de cáncer de mama pueden unirse y activar el GPR40, el cual se encuentra asociado a proteínas Gi/o o Gq (Navarro-Tito *et al.*, 2008), y una vez activados, a través de un proceso de transactivación, el EGFR puede ser fosforilado y activar cascadas de señalización que regulan la expresión de genes y el comportamiento celular canceroso (Liebmann, 2011). Nuestros resultados indican que el AL induce migración en células de cáncer de mama metastásicas a través de la activación de la PLD1 (Figura 2), cuya función ha sido implicada en la progresión del cáncer. Considerando reportes previos sobre el efecto de AGL de cadena media y larga en células de cáncer,

proponemos que el mecanismo molecular por el cual el AL induce la activación de PLD1 y la migración celular, a través de GPR40 y GPR120 acoplados, ya sea a proteínas heterotriméricas Gi/Go o Gq/11, promoviendo la fosforilación y activación del EGFR a través de un proceso de transactivación que involucra la activación de Src y MMP de membrana que liberan prolifandos (HB-EGF) específicos. EGFR una vez activo promueve la activación y reclutamiento de PLD1 a membrana plasmática, regulando así la actividad de proteínas de señalización y del citoesqueleto implicadas en la migración celular. En particular, AL es capaz de inducir fosforilación de FAK en células de cáncer de mama MDA-MB-231, siendo ésta un posible blanco de PLD1, cuya fosforilación se ve aumenta en respuesta a la activación de PLD en células de linfoma EL4 (Knoepp *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para determinar dicha relación (Figura 10). De manera simultánea, AL posiblemente a través de la activación de GPR40 o GPR120 y posterior transactivación de EGFR, puede promover la activación de NFκB, posiblemente a través de la vía de señalización de ERK1/2, principal activadora de este factor de transcripción. Por otro lado, se ha reportado que ERK1/2 puede activar otros factores de transcripción como AP-1 en células de cáncer de mama ante el estímulo con AO, un AGL de cadena larga (Soto-Guzman *et al.*, 2008) (Figura 10).

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que el AL induce migración de células de cáncer de mama invasivas MDA-MB-231 y que la actividad de PLD1 es un punto clave durante la señalización en este proceso. Así mismo, es la isoforma 1 de PLD la que participa en la reorganización del citoesqueleto de actina y formación de adhesiones focales como consecuencia del estímulo con AL. En contraste, el AL no es capaz de inducir migración de células de cáncer con poca capacidad invasiva y metastásica MCF-7. Por otra parte, nuestros resultados indican que el AL promueve una activación transitoria del factor de transcripción NFκB de manera dependiente del tiempo y la concentración, alcanzado un máximo de activación a los 60 min de estímulo y regresando a niveles cercanos a los basales a los 90 min, siendo dicho efecto independiente de PLD.

En conjunto, nuestros resultados sugieren un papel importante de PLD1 en los mecanismos moleculares que induce el AL para promover migración de células de cáncer de mama, un proceso asociado a la progresión tumoral.

PERSPECTIVAS

- 1) Analizar el mecanismo molecular por el cual el AL induce la activación de PLD1 para promover migración celular.
- 2) Evaluar el efecto de AL sobre el estado de fosforilación de proteínas asociadas a las adhesiones focales como FAK, Src y P130Cas.
- 3) Determinar la participación de la vía Ras/ERK1/2 en la activación del factor de transcripción NFκB inducida por AL.
- 4) Evaluar el efecto de AL sobre el proceso de invasión en células de cáncer de mama.

REFERENCIAS

BRISCOE, C. P., TADAYYON, M., ANDREWS, J. L., BENSON, W. G., CHAMBERS, J. K., EILERT, M. M., ELLIS, C., ELSHOURBAGY, N. A., GOETZ, A. S., MINNICK, D. T., MURDOCK, P. R., SAULS, H. R., JR., SHABON, U., SPINAGE, L. D., STRUM, J. C., SZEKERES, P. G., TAN, K. B., WAY, J. M., IGNAR, D. M., WILSON, S. & MUIR, A. I. 2003. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*, 278, 11303-11.

BATH-NAKSHATRI, P., SWEENEY, C. J., NAKSHATRI, H. 2002. Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF- κ B activation in breast cancer cells. *Oncogene*, 21, 2066-2078.

BROWN, A. J., GOLDSWORTHY, S. M., BARNES, A. A., EILERT, M. M., TCHEANG, L., DANIELS, D., MUIR, A. I., WIGGLESWORTH, M. J., KINGHORN, I., FRASER, N. J., PIKE, N. B., STRUM, J. C., STEPLEWSKI, K. M., MURDOCK, P. R., HOLDER, J. C., MARSHALL, F. H., SZEKERES, P. G., WILSON, S., IGNAR, D. M., FOORD, S. M., WISE, A. & DOWELL, S. J. 2003. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*, 278, 11312-9.

CENTER, M., SIEGEL, R., JEMAL, A. 2011. Global Cancer Facts & Figures. *American Cancer Society*, 1-57.

CHAE, Y. C., KIM, J. H., KIM, K. L., KIM, H. W., LEE, H. Y., HEO, W. D., MEYER, T., SUH, P., RYU, S. H. 2008. Phospholipase D activity regulates integrin-mediated cell spreading and migration by inducing GTP-Rac translocation to the plasma membrane. *Mol Biol cell*, 19, 3111-3123.

CHAMBERS, A. F., GROOM, A. C., MACDONALD, I. C. 2002. Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev Cancer*, 2, 563-572.

DAS, U. N. 2006. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J*, 1, 420-39.

DE LA VARA-SALAZAR, E., SUAREZ-LOPEZ, L., ANGELES-LLERENAS, A., TORRES-MEJIA, G. & LAZCANO-PONCE, E. 2011. [Breast cancer mortality trends in Mexico, 1980-2009]. *Salud Publica Mex*, 53, 385-93.

DRUBE, S., STIRNWEISS, J., VALKOVA, C., LIEBMANN, C. 2006. Ligand-independent and EGF receptor-supported transactivation: lessons from β 2-adrenergic receptor signalling. *Cell Signal*, 18, 1633-1646.

ESPINOSA-NEIRA, R., MEJIA-RANGEL, J., CORTES-REYNOSA, P. & SALAZAR, E. P. 2011. Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 1782-91.

EXTON, J. H. 2004. Mammalian phospholipase D - properties and regulation. *Adv Mol Cell Biology*, 33, 451-462.

FAY, M. P., FREEDMAN, L. S., CLIFFORD, C. K., MIDTHUNE, D. N. 1997. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res*, 57, 3979-39.

FERRE, P. 2004. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S43-50.

GERTLER, F. & CONDEELIS, J. 2011. Metastasis: tumor cells becoming MENAcing. *Trends Cell Biol*, 21, 81-90.

GOODSTINE, S. L., ZHENG, T., HOLFORD, T. R., WARD, B. A., CARTER, D., OWENS, P. H. & MAYNE, S. T. 2003. Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women. *J Nutr*, 133, 1409-14.

GUPTA, S. C., SUNDARAM, C., REUTER, S. & AGGARWAL, B. B. 2010. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*, 1799, 775-87.

HANSEN, R. K. & BISSELL, M. J. 2000. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer*, 7, 95-113.

HIRASAWA, A., TSUMAYA, K., AWAJI, T., KATSUMA, S., ADACHI, T., YAMADA, M., SUGIMOTO, Y., MIYAZAKI, S. & TSUJIMOTO, G. 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*, 11, 90-4.

HUBBARD, S. R., MILLER, W. T. 2007. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 19(2), 117-123.

ITOH, Y., KAWAMATA, Y., HARADA, M., KOBAYASHI, M., FUJII, R., FUKUSUMI, S., OGI, K., HOSOYA, M., TANAKA, Y., UEJIMA, H., TANAKA, H., MARUYAMA, M., SATOH, R., OKUBO, S., KIZAWA, H., KOMATSU, H., MATSUMURA, F., NOGUCHI, Y., SHINOHARA, T., HINUMA, S., FUJISAWA, Y. & FUJINO, M. 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 422, 173-6.

JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.

JEMAL, A., CENTER, M. M., DESANTIS, C. & WARD, E. M. 2010. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19, 1893-907.

KAM, Y., EXTON, J. H. Phospholipase D activity is required for actin stress fiber formation in fibroblasts. *Mol and Cell Biol*, 21, 4055-4066.

KANG, D. W., PARK, M. H., LEE, Y. J., KIM, H. S., LINDSLEY, C. W., ALEX BROWN, H. & MIN DO, S. 2011. Autoregulation of phospholipase D activity

is coupled to selective induction of phospholipase D1 expression to promote invasion of breast cancer cells. *Int J Cancer*, 128, 805-16.

KHAN, N., AFAQ, F. & MUKHTAR, H. 2010. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett*, 293, 133-43.

KIM, D. W., SOVAK, M. A., ZANIESKI, G., NONET, G., ROMIEU-MOUREZ, R., LAU, A. W., HAFER, L. J., YASWEN, P., STAMPFER, M., ROGERS, A. E., RUSSO, J., SONENSHEIN, G. E. 2000. Activation of NF- κ B/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis*, 21, 871-879.

KNOEPP, S. M., CHAHAL, M. S., XIE, Y., ZHANG, Z., BRAUNER, D. J., HALLMAN, M. A., ROBINSON, S. A., HAN, S., IMAI, M., TOMLINSON, S., MEIER, K. E. 2008. Effects of active and inactive phospholipase D2 on signal transduction, adhesion, migration, invasion, and metastasis in EL4 lymphoma cells. *Mol Pharmacol*, 74, 574-584.

LEE, M. M., LIN, S. S. 2000. Dietary fat and breast cancer. *Annu Rev Nutr*, 20, 221-248.

LIEBMANN, C. 2011. EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions. *Mol Cell Endocrinol*, 331, 222-31.

LITTON, J. K., GONZALEZ-ANGULO, A. M., WARNEKE, C. L., BUZDAR, A. U., KAU, S. W., BONDY, M., MAHABIR, S., HORTOBAGYI, G. N. & BREWSTER, A. M. 2008. Relationship between obesity and pathologic response to neoadjuvant chemotherapy among women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*, 26, 4072-7.

MARTINEZ-OROZCO, R., NAVARRO-TITO, N., SOTO-GUZMAN, A., CASTRO-SANCHEZ, L. & PEREZ SALAZAR, E. 2010. Arachidonic acid promotes epithelial-to-mesenchymal-like transition in mammary epithelial cells MCF10A. *Eur J Cell Biol*, 89, 476-88.

MCARTHUR, M. J., ATSHAVES, B. P., FROLOV, A., FOXWORTH, W. D., KIER, A. B. & SCHROEDER, F. 1999. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res*, 40, 1371-83.

MCPHERSON, K., STEEL, C. M. & DIXON, J. M. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, 321, 624-8.

MONOVICH, L., MUGRAGE, B., QUADROS, E., TOSCANO, K., TOMASSI, R., LAVOIE, S., LIU, E., DU, Z., LASALA, D., BOYAR, W., STEED, P. 2007. Optimization of Halopemide for Phospholipase D inhibition. *Bio Med Chem Lett*, 17, 2310-2311.

MURFF, H. J., SHU, X. O., LI, H., YANG, G., WU, X., CAI, H., WEN, W., GAO, Y. T. & ZHENG, W. 2011. Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study. *Int J Cancer*, 128, 1434-41.

NAVARRO-TITO, N., ROBLEDO, T. & SALAZAR, E. P. 2008. Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 314, 3340-55.

NAVARRO-TITO, N., SOTO-GUZMAN, A., CASTRO-SANCHEZ, L., MARTINEZ-OROZCO, R. & SALAZAR, E. P. 2010. Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 306-17.

PALACIO-MEJIA, L. S., LAZCANO-PONCE, E., ALLEN-LEIGH, B. & HERNANDEZ-AVILA, M. 2009. Regional differences in breast and cervical cancer mortality in Mexico between 1979-2006. *Salud Publica Mex*, 51 Suppl 2, s208-19.

PARSONS, J. T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116, 1409-16.

PRIBIC, J., BRAZILL, D. 2012. Paxillin phosphorylation and complexing with Erk and FAK are regulated by PLD activity in MDA-MB-231 cells. *Cellular Signalling*, 24, 1531-1540.

SAUER, L. A., DAUCHY, R. T. & BLASK, D. E. 2000. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. *Cancer Res*, 60, 5289-95.

SCOTT, S. A., SELVY, P. E., BUCK, J. R., CHO, H. P., CRISWELL, T. L., THOMAS, A. L., ARMSTRONG, M. D., ARTEAGA, C. L., LINDSLEY, C. W., BROWN, H. A. 2009. Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. *Nat Chem Biol*, 5, 1008-17.

SCHULZ, M., HOFFMANN, K., WEIKERT, U., NOTHLINGS, M. B., SCHULZE, M. B., BOEING, H. 2008. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Br J Nutr*, 100, 942-946.

SCHALLER, M. D. 2001. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 20, 6459-6472.

SERNA-MARQUEZ, N., VILLEGAS-COMONFORT, S., GALINDO-HERNANDEZ, O., NAVARRO-TITO, N., MILLAN, A., SALAZAR, E.P. 2012. Role of LOXs and COX-2 on FAK activation and cell migration induced by linoleic acid in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Oncol*, 36(1): 65-77.

SIERI, S., KROGH, V., FERRARI, P., BERRINO, F., PALA, V., THIEBAUT, A. C., TJONNELAND, A., OLSEN, A., OVERVAD, K., JAKOBSEN, M. U., CLAVEL-CHAPELON, F., CHAJES, V., BOUTRON-RUAULT, M. C., KAAKS, R., LINSEISEN, J., BOEING, H., NOTHLINGS, U., TRICHOPOULOU, A., NASKA, A., LAGIOU, P., PANICO, S., PALLI, D., VINEIS, P., TUMINO, R., LUND, E., KUMLE, M., SKEIE, G., GONZALEZ, C. A., ARDANAZ, E., AMIANO, P., TORMO, M. J., MARTINEZ-GARCIA, C., QUIROS, J. R., BERGLUND, G., GULLBERG, B., HALLMANS, G., LENNER, P., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., VAN DUIJNHOFEN, F. J., PEETERS, P. H., VAN GILS, C. H., KEY, T. J., CROWE, F.

L., BINGHAM, S., KHAW, K. T., RINALDI, S., SLIMANI, N., JENAB, M., NORAT, T. & RIBOLI, E. 2008. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr*, 88, 1304-12.

SIMOPOULOS, A. P. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother*, 60, 502-507.

SOTO-GUZMAN, A., NAVARRO-TITO, N., CASTRO-SANCHEZ, L., MARTINEZ-OROZCO, R. & PEREZ SALAZAR, E. 2010. Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 27, 505-507.

SOTO-GUZMAN, A., ROBLEDO, T., LOPEZ-PEREZ, M. & SALAZAR, E. P. 2008. Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 294, 81-91.

STEEG, P. S. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 12, 895-904.

TAFANI, M., PUCCI, B., RUSSO, A., SCHITO, L., PELLEGRINI, L., PERRONE, G. A., VILLANOVA, L., SALVATORI, L., RAVENNA, L., PETRANGELI, E. & RUSSO, M. A. 2013. Modulators of HIF1alpha and NFkB in Cancer Treatment: Is it a Rational Approach for Controlling Malignant Progression? *Front Pharmacol*, 4, 13.

XIONG, Y., MIYAMOTO, N., SHIBATA, K., VALASEK, M. A., MOTOIKE, T., KEDZIERSKI, R. M. & YANAGISAWA, M. 2004. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1045-50.

YONEZAWA, T., KATOH, K. & OBARA, Y. 2004. Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun*, 314, 805-9.

WATT, H.L., KHARMATE, G.D., KUMAR, U. 2009. Somatostatin receptors 1 and 5 heterodimerize with epidermal growth factor receptor: agonist-dependent modulation of the downstream MAPK signalling pathway in breast cancer cells. *Cell Signal*, 21, 428-439.

ZHENG, Y., RODRIK, V., TOSCHI, A., SHI, M., HUI, L., SHEN, Y., FOSTER, D. A. 2006. Phospholipase D couples survival and migration signals in stress response of human cancer cells. *J Biol Chem*, 281, 15862-15868.