

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Biología Celular

**Participación de Src y FAK en la migración e invasión celular inducida por
vesículas extracelulares derivadas de células cancerosas mamarias**

Tesis que presenta:

M. en C. Javier Ramírez Ricardo

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

con especialidad en Biología Celular

Directores de tesis:

Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Dra. María del Rocío Thompson Bonilla

Ciudad de México, noviembre de 2020

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. José Eduardo Pérez Salazar y de la Dra. María del Rocío Thompson Bonilla, siendo becario CONACYT de agosto de 2014 a julio de 2018 con número de registro: 488878.

Este trabajo contó con el apoyo económico de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), otorgado para el proyecto: 255429. Así como de CONACYT-FOSISS (Salud 2015-1-261637).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación, por su asesoría y tiempo invertido en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. María del Rocío Thompson Bonilla, por fungir como tutora externa, por su asesoría y sus valiosos consejos.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, la Dra. Mireya de la Garza Amaya, a la Dra. Emma S. Calderón Aranda y al Dr. José de Jesús Serrano Luna, por su apoyo y valiosa asesoría en la revisión de esta tesis.

A todos los miembros del Laboratorio #42 que conocí en los distintos periodos.

A Pedro Cortés Reynosa y a Nora Araceli Ruíz Durán por su apoyo técnico en el laboratorio.

A Clara Hernández Chávez por toda su ayuda administrativa.

DEDICATORIAS

A mi familia.

INDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	2
III. ABSTRACT	3
IV. INTRODUCCIÓN	4
IV.1. Glándula mamaria	4
IV. 2. Cáncer de mama	5
IV. 3. Cáncer de mama triple negativo	8
IV. 4. Factores de riesgos	9
IV. 4. 1. Factores hormonales y reproductivos.....	9
IV. 4. 2. Factores genéticos.....	10
IV. 4. 3. Factores relacionados al estilo de vida.....	11
IV. 4. 4. Obesidad y sobrepeso.....	11
IV. 4. 5. Participación de los ácidos grasos en el desarrollo de cáncer de mama	12
IV. 5. El complejo de cinasa dual Src/FAK en cáncer de mama.....	14
IV. 6. Papel de las metaloproteinasas 2 y 9 en cáncer de mama	18
IV. 7. Vesículas extracelulares (VEs)	19
IV. 7. 1. VEs y cáncer	20
IV. 7. 2. VEs y cáncer de mama.....	23
V. JUSTIFICACIÓN	27
VI. HIPÓTESIS	28
VII. OBJETIVO GENERAL	29
VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	31

IX. 1. Materiales.....	31
IX. 2. Cultivos celulares	32
IX. 3. Pacientes.....	32
IX. 4. Estimulación con AL	34
IX. 5. Aislamiento de VEs derivadas de medios condicionados de células MDA-MB-231 tratadas o no tratadas con AL.....	35
IX. 6. Enriquecimiento de VEs a partir del plasma de mujeres sanas y con cáncer de mama.....	35
IX. 7. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	36
IX. 8. Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).....	36
IX. 9. Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”	36
IX. 10. Ensayos de invasión.....	37
IX. 11. Inmunodetección	38
IX. 12. Análisis de inmunofluorescencia por Microscopía Confocal.....	38
IX. 13. Zimografía en gelatina	39
IX. 14. Ensayo de proliferación	40
IX. 15. Ensayo de tinción y captura de VEs	40
IX. 16. Análisis estadístico	41
X. RESULTADOS	42
X. 1. Resultados correspondientes a VEs liberadas por las células MDA-MB-231 estimuladas con AL	42
X. 1. 1. Caracterización de VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con y sin AL.....	42
X. 1. 2. VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen migración e invasión	44

X. 1. 3. VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la activación de Src, FAK y Akt2.	47
X. 1. 4. VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la formación de contactos focales.....	49
X. 1. 5. Las VEs secretadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la activación de FAK y Akt2 a través de una vía dependiente e independiente de Src, respectivamente	51
X. 1. 6. VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración e invasión a través de una vía dependiente de la actividad de Src	53
X. 1. 7. Las células MDA-MB-231 capturan las VEs liberadas por células MDA-MB-231 con y sin tratamiento con AL.	55
X. 2. Resultados con vesículas derivadas de pacientes con cáncer de mama ..	57
X. 2. 1. Las VEs de plasma de mujeres con cáncer de mama inducen migración de células MDA-MB-231.....	57
X. 2. 2. Las células MDA-MB-231 capturan las VEs de mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama.	61
X. 2. 3. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la secreción de gelatinasas.	64
X. 2. 4. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la activación de Src.....	66
X. 2. 5. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la activación de FAK a través de la actividad Src.....	68
X. 2. 6. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la redistribución de p-FAK y el ensamblaje de adhesiones focales.....	71
X. 2. 7. Participación de Src en la migración e invasión inducida por VEs de pacientes con cáncer de mama.	73

XI. DISCUSIÓN	76
XI. 1. Discusión de los resultados con VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL.....	76
XI. 2. Discusión de los resultados con VEs derivadas de plasma de pacientes con cáncer de mama.	81
XII. CONCLUSIONES	90
XIII. PERSPECTIVAS	92
XIV. REFERENCIAS	93
XV. ANEXOS	110
XV. 1. Role of Src/FAK in migration and invasion promoted by extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid.....	110
XV. 2. Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells.....	147

I. ABREVIATURAS

AL: Ácido linoleico

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

EFA: Ácidos grasos esenciales

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ETK: Tirosina cinasa epitelial y endotelial

FAK: Cinasa de adhesión focal

FFAR1: Receptor de ácidos grasos libres 1

FFAR4: Receptor de ácidos grasos libres 4

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

HRP: Peroxidasa de rábano picante

MEC: Matriz extracelular

MMPs: Metaloproteinasas

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PBS: Solución de buffer de fosfatos

PDB: Forbol 12, 13-dibutirato

PS: Fosfatidilserina

RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de progesterona

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

TNBC: Cáncer de mama triple negativo

TEM: Transición epitelio-mesénquima

VEs: Vesículas extracelulares

II. RESUMEN

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente y principal causa de muerte de mujeres en México y en todo el mundo. Numerosos estudios reportaron que una dieta rica en ácidos grasos incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Entre ellos, destaca el ácido linoleico (AL), el más abundante en la dieta occidental. Estudios previos demostraron que el AL induce proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama e induce un proceso tipo transición epitelio-mesénquima en células epiteliales mamarias MCF10A. Por otra parte, la comunicación celular es un mecanismo importante durante el inicio, la progresión y la metástasis tumoral. En particular, la comunicación mediada por pequeños fragmentos esféricos de membrana, denominados vesículas extracelulares (VEs) que participan en tales procesos. Sin embargo, cómo las VEs promueven la migración e invasión en cáncer de mama, no ha sido totalmente dilucidado. El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de las VEs secretadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL y VEs de pacientes con cáncer de mama en los procesos de migración e invasión. Los resultados de este trabajo muestran que las VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL (VEs AL) y las VEs derivadas de pacientes con cáncer de mama (VEs CM) promueven la secreción de las metaloproteinasas 2 y 9, e incrementan la migración e invasión de las células MDA-MB-231. Además, las VEs AL y VEs CM inducen la activación de las cinasas Src y FAK, y promueven el ensamble de adhesiones focales. Adicionalmente, las VEs AL promueven la activación de Akt-2. En resumen, las VEs AL y VEs CM incrementan la migración e invasión de células MDA-MB-231 a través de una vía dependiente del complejo cinasa dual Src/FAK.

III. ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent neoplasia and the leading cause of deaths associated with cancer in women worldwide. Epidemiological studies demonstrate that the consumption of Western diets, which is characterized by a low consumption of omega-3 fatty acids, and a high consumption of omega-6 fatty acids is associated with a higher risk of develop several cancer types, including breast cancer. Linoleic acid (LA) is an essential omega-6 polyunsaturated fatty acid that represents the most abundant polyunsaturated fatty acid in occidental diets. Moreover, LA induces an increase of phospholipase D activity and a variety of cellular processes, such as migration and invasion in human breast cancer cells, and an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process in the human mammary nontumorigenic epithelial cells MCF10A. In other hand, extracellular vesicles (EVs) are vesicles derived from endosomes and plasma membrane that are composed of a variety of molecules, including proteins, nucleic acids and lipids. The present study investigated whether EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA and EVs from breast cancer patients induce migration and invasion and the signal transduction pathways that mediate these processes. The present study demonstrated that stimulation of MDA-MB-231 cells with EVs secreted by MDA-MB-231 cells treated with LA (LA EVs) and EVs from breast cancer patients (BC EVs) promoted migration and invasion. LA EVs and BC EVs increased the phosphorylation of Src and FAK. Additionally, LA EVs triggered activation of Akt2. LA EVs and BC EVs also induced the assembly of focal adhesions and MMP-9 secretion. Treatment with the selective Src family kinase inhibitor PP-2 markedly reduced the phosphorylation of FAK-Tyr397 and FAK-Tyr577, resulting in inhibition of migration and invasion promoted by LA EVs and BC EVs. In summary, these findings demonstrated that LA EVs and BC EVs mediate migration and invasion via a Src/FAK signaling pathway.

IV. INTRODUCCIÓN

IV.1. Glándula mamaria

La glándula mamaria es un órgano que se desarrolla a partir de células procedentes del ectodermo de la capa germinal y es un órgano que, a lo largo de la vida, experimentará distintos cambios debido a la influencia de hormonas; incluso después de alcanzar la edad adulta sigue desarrollándose, especialmente durante el embarazo y la lactancia (Macias and Hinck, 2012). Con relación a la estructura, la glándula mamaria está constituida por un sistema radial de 15 a 20 lóbulos, conectados a túbulos, conocidos como *ductos*, los cuales realizan el transporte de la leche desde los alveolos hasta el pezón. Los ductos y lóbulos son estructuras formadas por una capa continua de células epiteliales luminales, seguida de una capa de células mioepiteliales, estas últimas contactan con la membrana basal, la cual delimita el tejido mamario con el estroma. El estroma, en cambio, está conformado por varios tipos celulares, incluyendo: fibroblastos, adipocitos, leucocitos y células endoteliales (Figura 1). Debido a la naturaleza del tejido mamario y la exposición a hormonas en las distintas etapas de la vida femenina, así como factores intrínsecos y extrínsecos, la mama está propensa a desarrollar diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (Macias and Hinck, 2012, Hassiotou and Geddes, 2013).

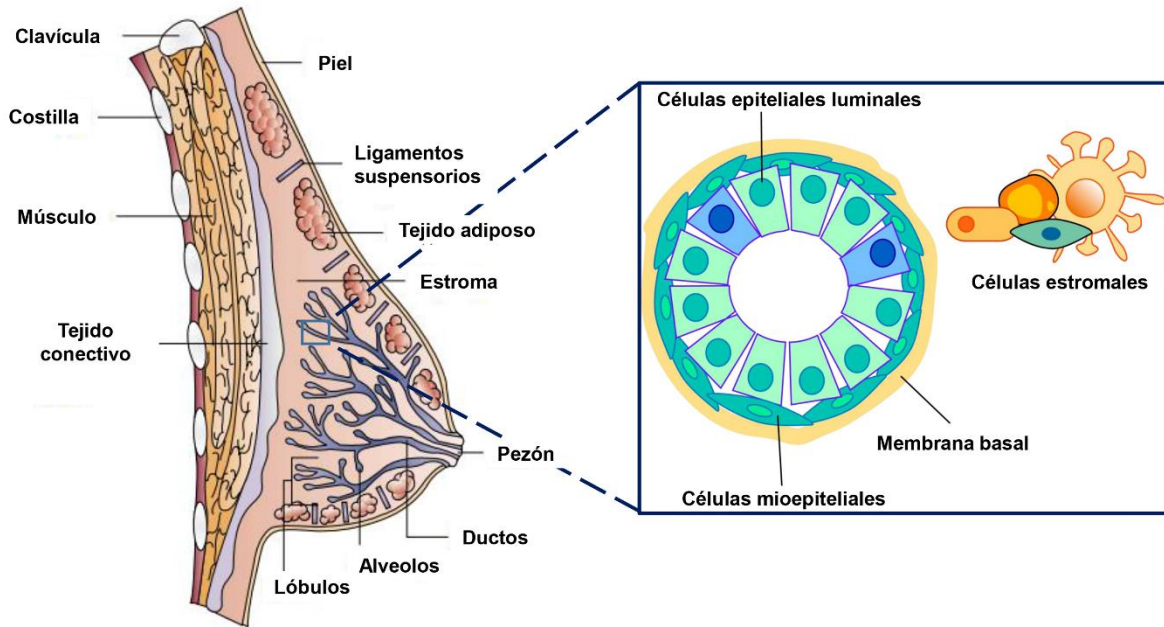


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria. La glándula mamaria dispone de un sistema de lóbulos y ductos que desembocan en el pezón. Estas unidades funcionales están compuestas de dos tipos celulares, las células epiteliales luminales y las células mioepiteliales. Imagen modificada de Ali *et al.*, 2002.

IV. 2. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que resulta de la proliferación descontrolada de células tumorales, esto como consecuencia de alteraciones a nivel genético y epigenético. Mientras que los tumores de origen ductal son los más abundantes, representando el 80% del total de los cánceres de mama, los tumores de tipo lobular representan el 20%. No obstante, con menor frecuencia, el cáncer de mama puede originarse en el tejido estromal, que incluye a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama (Polyak and Kalluri, 2010, Harbeck et al., 2019).

De acuerdo a los datos reportados en el 2018 por la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), el cáncer de mama fue el más comúnmente diagnosticado en la mujer, con una tasa de incidencia que

representó el 24.2%. Esto significa que uno de cada cuatro nuevos casos de cáncer diagnosticados en la mujer a nivel mundial, correspondió a cáncer de mama. Asimismo, este cáncer fue el más común en 154 países de los 185 existentes, estimándose que para finales de ese año, se presentaron aproximadamente 2.1 millones de nuevos casos (Bray et al., 2018).

La incidencia de cáncer de mama varía según la región geográfica, las tasas más altas se presentan en regiones con países de economías desarrolladas, tales como Norteamérica, Europa y Australia; en contraste, las tasas más bajas se presentan en regiones de Asia, África y América Latina (Bray et al., 2018). Con relación a México, desde el año 2006, el cáncer de mama ha mostrado una tendencia hacia el incremento entre la población femenina de 25 años en adelante, ocupando el primer lugar como causa de muerte relacionado a enfermedades neoplásicas (Chavarri-Guerra et al., 2012, Knaul et al., 2008). Notablemente, esta enfermedad se presenta en una edad promedio de 40 años en mujeres mexicanas, una década antes que en mujeres europeas y estadounidenses. Con respecto a la distribución geográfica, las tasas de mortalidad más elevadas se reportan en estados del norte y centro del país, incluyendo Baja California Norte, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Jalisco, Colima, Nayarit, Aguascalientes, Zacatecas y Ciudad de México; mientras que estados como Quintana Roo, Campeche, Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Guerrero registran las tasas de mortalidad más bajas. Esta distribución heterogénea está relacionada con el hecho de que, en los estados del norte y centro del país, la población tiene un nivel socio-económico más elevado, lo cual se relaciona con modificaciones en el estilo de vida que favorecen el sobrepeso y la

obesidad; éstos son comorbilidades asociadas con el desarrollo de cáncer, entre ellas el cáncer de mama. No obstante, esta brecha entre los estados se va haciendo cada vez más delgada, por la creciente urbanización de pueblos rurales, adoptando estilos de vida y hábitos alimenticios que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades como cáncer en estas poblaciones (Robles-Castillo et al., Rodríguez et al., 2005).

La clasificación molecular propuesta por Perou *et al*, en el 2000, estableció cuatro subtipos de cáncer de mama: luminal A, luminal B, enriquecido en el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el tipo basal. Los tumores luminales son positivos a receptor de estrógeno (RE), mientras los HER2 positivo no expresan el RE. Los tipos basales no expresan ni receptores hormonales ni HER2 (Perou et al., 2000). Esta clasificación cambió el manejo clínico del cáncer de mama, principalmente porque ahora se utiliza un enfoque que considera la biología del tumor. Actualmente, en la práctica clínica se utiliza una clasificación sustituta de cinco subtipos, que toma en cuenta las características histológicas y moleculares del tumor. Los tumores que expresan RE y/o receptor de progesterona (RP) se consideran cáncer de mama con receptores hormonales positivos, mientras que los tumores que no expresan RE, RP o HER2 son cáncer de mama triple negativo (Harbeck et al., 2019).

IV. 3. Cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo (TNBC por sus siglas en inglés), corresponde a un subtipo de cáncer de mama, que se caracteriza por la nula expresión de los RP, RE, así como no hay expresión de HER2. Además, representa del 15-20% de los tumores mamarios, siendo el subtipo más agresivo y con una pobre respuesta a los tratamientos actuales, lo que lo convierte en el de peor pronóstico. En este contexto, el tratamiento de tumores triple negativo está limitado por la ausencia de blancos moleculares bien definidos, siendo el único tratamiento la quimioterapia convencional, con los efectos colaterales inherentes. A pesar de la terapia de primera línea, la recurrencia y la metástasis ocurren con frecuencia en los primeros 3 años después de la cirugía, y la tasa de supervivencia a 5 años para estas pacientes es muy baja (77% en comparación con 93% para otros subtipos de cáncer de mama). Por las razones expuestas, resulta importante entender la biología de este subtipo de tumor mamario, los mecanismos que subyacen su agresividad, con el objetivo de encontrar nuevos blancos terapéuticos o marcadores moleculares para contar con un diagnóstico temprano (Bianchini et al., 2016, Garrido-Castro et al., 2019).

IV. 4. Factores de riesgos

Un número significativo de factores está asociado con el desarrollo de cáncer de mama; en general podemos dividir estos factores en tres tipos:

IV. 4. 1. Factores hormonales y reproductivos.

Los factores hormonales y reproductivos corresponden a una clase de factores que están asociados propiamente con el género. La mama es una glándula que experimenta distintos cambios a lo largo de la vida. Estos cambios están influenciados profundamente por hormonas como estrógeno y progesterona (Briskin and O'Malley, 2010). En este contexto, aquellas mujeres que presentan una menarca temprana y una menopausia tardía, serán más propensas a desarrollar tumor mamario, esto como consecuencia de una exposición muy larga a hormonas, como los estrógenos. Asimismo, las mujeres nulíparas o que tienen su primer hijo después de los treinta años de edad, tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, debido a que el embarazo y la lactación son considerados como factores protectores, y esto se explica porque durante el embarazo y la lactación, las células de la glándula mamaria entran a una etapa de diferenciación y las células que son diferenciadas son menos propensas a sufrir mutación en su ADN. En esta clasificación también se enlista el consumo de anticonceptivos orales y el uso de terapia hormonal de reemplazo. Con relación al primero, algunos estudios señalan que el consumo de anticonceptivos orales incrementa ligeramente el riesgo de desarrollar cáncer mamario; esto dependerá de la edad de la mujer cuando inicie el tratamiento, la duración del mismo, la dosis y el

tipo de hormona. Cabe resaltar que, mujeres que comienzan a usar anticonceptivos orales antes de los 20 años de edad, parecen tener un riesgo relativo más alto comparado con las mujeres que comienzan a usarlos a una edad más avanzada. No obstante, una vez que se suspenden los anticonceptivos, este riesgo parece regresar a la normalidad en un plazo de 10 años. Por su parte, el uso de terapia hormonal de remplazo durante la menopausia por periodos superiores a tres años se relaciona con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama (McPherson et al., 2000).

IV. 4. 2. Factores genéticos.

Alrededor del 5% al 10% de los casos de cáncer de mama son hereditarios, lo que significa que son consecuencia directa de las mutaciones genéticas heredadas de un progenitor. Diversos estudios han identificado dos genes principales de susceptibilidad: el gen BRCA-1 localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21), aislado en 1994 y el gen BRCA-2, localizado en el cromosoma 13 (13q12), aislado a finales de 1995. En las células normales, estos genes ayudan a prevenir el cáncer produciendo proteínas que mantienen el crecimiento normal de las células. Aunque en algunas familias con mutaciones BRCA1, el riesgo de desarrollar cáncer de mama es tan alto como del 80%; en promedio, este riesgo parece estar en el intervalo de 55 a 65%. El cáncer de mama debido a mutaciones en el gen BRCA2, representa un riesgo menor, alrededor del 45% (Mahdavi et al., 2019).

IV. 4. 3. Factores relacionados al estilo de vida.

Los estudios epidemiológicos han mostrado que los factores relacionados al estilo de vida juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer de mama. Particularmente, un estudio observacional encontró que las hijas de mujeres asiáticas que migraron a los EE.UU., presentaron un riesgo creciente de desarrollar cáncer de mama, el cual se atribuyó a factores nutricionales y de estilo de vida. La evidencia de que los cambios en los patrones de estilo de vida influyen en el desarrollo de cáncer de mama ha cobrado importancia en todos los países, independientemente del nivel de desarrollo económico. Nuevamente, este hallazgo está relacionado con un movimiento hacia un estilo de vida más moderno y "*occidental*". En consecuencia, los factores de riesgo modificables y del estilo de vida son importantes a tener en cuenta al desarrollar una estrategia para la prevención de cáncer de mama (Dieterich et al., 2014).

IV. 4. 4. Obesidad y sobrepeso

El sobrepeso y la obesidad pertenecen a los factores relacionados al estilo de vida. Se ha reportado que después de la menopausia son un factor de riesgo que aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer de mama. Este hecho se explica porque previo a la menopausia los ovarios producen la mayor parte del estrógeno, mientras el tejido graso produce una cantidad mínima de estrógeno. Posterior a la menopausia (cuando los ovarios dejan de producir estrógeno), la mayor parte del estrógeno empieza a ser sintetizado en el tejido graso. Por consiguiente, la presencia de más tejido adiposo después de la menopausia puede aumentar la

probabilidad de desarrollar cáncer de mama como consecuencia del aumento de los niveles de estrógeno. Asimismo, las mujeres con sobrepeso tienden a presentar concentraciones elevadas de insulina en sangre, y los niveles elevados de insulina están relacionados con el desarrollo de algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama (Hillers-Ziemer and Arendt, 2020).

IV. 4. 5. Participación de los ácidos grasos en el desarrollo de cáncer de mama

La salud del ser humano está relacionada de manera estrecha con la nutrición; la cual actúa como factor protector y en otras como factor promotor de patologías; por lo que esto ha sido un tema de estudio de muchos investigadores alrededor del mundo. Cada día surgen nuevas evidencias, de modelos epidemiológicos, de modelos animales o modelos *in vitro*, que demuestran la asociación de las mismas. Uno de los temas más controversiales es sobre la dieta rica en grasas, y en particular de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos, los cuales son constituyentes de la bicapa lipídica de todas las membranas celulares. En los mamíferos, incluido el ser humano, la mayoría de los ácidos grasos se encuentran en forma de triglicéridos y son almacenados en el tejido adiposo. Los ácidos grasos ejercen funciones de suma importancia en muchos tejidos, regulando diversos procesos biológicos como el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación celular (Benatti et al., 2004). Sin embargo, estudios epidemiológicos y de modelos animales sugieren una fuerte asociación entre niveles elevados de consumo de ácidos grasos

y un incremento de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama (Azrad et al., 2013, Chajes et al., 2012, Murff et al., 2011).

Además, los ácidos grasos libres, median la expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa y lípidos, mediante su señalización a través de los receptores activados por peroxisomas proliferativos (PPARS) (Georgiadi and Kersten, 2012). Los ácidos grasos también ejercen funciones directamente a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), estos receptores se clasifican en función de la longitud de la cadena del ácido graso que reconocen. Los receptores de ácidos grasos libres (FFAR) FFAR2 y FFAR3 (conocidos anteriormente como GPR43 y GPR41, respectivamente) son activados por ácidos grasos de cadena corta, mientras que FFAR1 y FFAR4 (conocidos anteriormente como GPR40 y GPR120, respectivamente) son activados por ácidos grasos de cadena mediana y larga (Houthuijzen, 2016, van Jaarsveld et al., 2016). Los análisis farmacológicos de FFAR1 y su distribución en los tejidos sugieren que este receptor tiene funciones importantes en células pancreáticas y en la función neurológica. Por su parte, FFAR4 se expresa en las células endocrinas del intestino promoviendo la secreción del péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) (Hirasawa et al., 2005). Esta familia de receptores se encuentra acoplada a proteínas Gi/G0 y Gq/G11, por lo que su interacción con sus respectivos ligandos resulta en la activación de diversas vías de señalización con efectos biológicos variados (Hara et al., 2013). En la glándula mamaria sana, los ácidos grasos libres se utilizan como fuente principal de energía y para la síntesis de lípidos de la leche, mientras que en las células de cáncer de mama, los ácidos grasos libres inducen procesos celulares independientes de

PPARs, incluyendo proliferación, migración e invasión (MacLennan and Ma, 2010). Entre estos ácidos grasos, destacan los ácidos grasos esenciales (EFAs, por sus siglas en inglés), los cuales son necesarios para la vida y como no pueden ser producidos de manera endógena, deben ser obtenidos a través de la dieta, siendo por ello que reciben el nombre de esenciales. Existen dos tipos principales de EFAs, los de la serie ω -3 y los de la serie ω -6; entre éstos el ácido graso ω -6 más importante es el ácido linoleico (AL), un ácido graso poli-insaturado de dieciocho carbonos, el cual se encuentra en grandes cantidades en el aceite de maíz, girasol, soya y cártamo. El AL es metabolizado a través de varias vías incluyendo la conversión a ácido araquidónico (AA), el cual es el precursor de una variedad de eicosanoides, tales como prostaglandinas (PGs). Estudios previos demostraron que los ácidos grasos ω -3 tiene una actividad anti-tumoral, mientras que los ácidos grasos ω -6 mostraron tener un papel pro-tumoral (Navarro-Tito et al., 2008, Serna-Marquez et al., 2017, Villegas-Comonfort et al., 2014, Hannafon et al., 2015, Khadge et al., 2018). Específicamente, el AL es un ácido graso ω -6 que es capaz de inducir procesos como proliferación, migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mama, e induce un proceso de tipo transición epitelio-mesénquima en una línea celular no tumorigénica, denominada MCF-10A (Byon et al., 2009, Reyes et al., 2004, Serna-Marquez et al., 2017, Serna-Marquez et al., 2013).

IV. 5. El complejo de cinasa dual Src/FAK en cáncer de mama

La cinasa de adhesión focal (FAK), es una cinasa citoplasmática que fosforila tirosinas, la cual regula una amplia variedad de eventos celulares incluyendo proliferación, adhesión, migración, invasión y sobrevivencia celular. La cinasa FAK

integra y promueve la activación de diversas rutas de señalización gracias a su naturaleza estructural caracterizada por los dominios: FERM (banda 4.1-ezrina-radixina-moesina de eritrocito), dominio cinasa central, dominio rico en prolina y dominio FAT (dominio de orientación a adhesión focal). El dominio FERM, ubicado en el extremo N-terminal, le permite interactuar con varios receptores membranales incluyendo EGFR, PDGFR, GPCRs, o bien interaccionar con otras cinasas de tirosinas que no son receptores, tales como ETK (tirosina cinasa epitelial y endotelial). Además, el dominio FERM, tiene un papel regulatorio, ya que en el estado inactivo de FAK, el dominio FERM se encuentra interaccionando con el dominio cinasa central, bloqueando la accesibilidad a la tirosina (Tyr397) y la autofosforilación de FAK. A continuación del dominio FERM se encuentra el dominio de cinasa central, en el cual se encuentran los residuos de Tyr576 y Tyr577, cruciales para la actividad máxima de FAK, y río arriba del dominio cinasa, se localiza el residuo Tyr397, que se autofosforila e indica la activación de FAK. Este además es importante para la interacción de FAK con proteínas con dominios SH2, tales como PLC γ , GRB7, la subunidad regulatoria p85 de PI3K e importantemente la proteína Src. La autofosforilación de este sitio es crucial para muchos eventos biológicos de FAK, incluyendo la migración, la progresión del ciclo celular y el escape de la apoptosis. Por su parte, el dominio FAT, ubicado en el extremo C-terminal, media la localización de FAK en los sitios de adhesiones focales, las cuales son estructuras donde se enlaza la matriz extracelular (MEC) con el citoesqueleto de actina a través de receptores conocidos como integrinas. En las adhesiones focales, FAK tiene un papel dual, por un lado, como proteína cinasa, y segundo, como proteína de andamiaje. Respecto a este último, esa propiedad los confiere

sus dominios FERM y FAT, como mencionamos anteriormente. Por su parte, el dominio rico en prolina, le permite interactuar con proteínas con dominio SH3 como, por ejemplo: la proteína adaptadora p130Cas y ASAP1. Cabe mencionar que FAK es el regulador maestro del ensamble y desensamble de las adhesiones focales, siendo esta dinámica la que regula la migración celular y es una característica típica de las células cancerosas con alta capacidad migratoria (Figura 2A) (Mitra et al., 2005).

La cinasa FAK se activa por la activación de diferentes receptores membranales, incluyendo, integrinas, receptores a citocinas y por GPCRs (Figura 2B). Una vez activada FAK, forma un complejo de señalización dual con Src. En este complejo Src/FAK, la cinasa Src fosforila a FAK en sus residuos Tyr576 y Tyr577 dentro del dominio cinasa. Asimismo, fosforila el residuo Tyr925 creando un sitio de unión para la proteína GRB2, la cual es una de las varias conexiones que conduce a la activación de Ras y a la vía de las MAPK. Mientras que la fosforilación del residuo Tyr861 de FAK, media su unión con P130CAS, conduciendo a un incremento de actividad de la GTPasa Rac, la cual potencia la formación de lamelipodios, y por lo tanto la migración celular (Bolos et al., 2010).

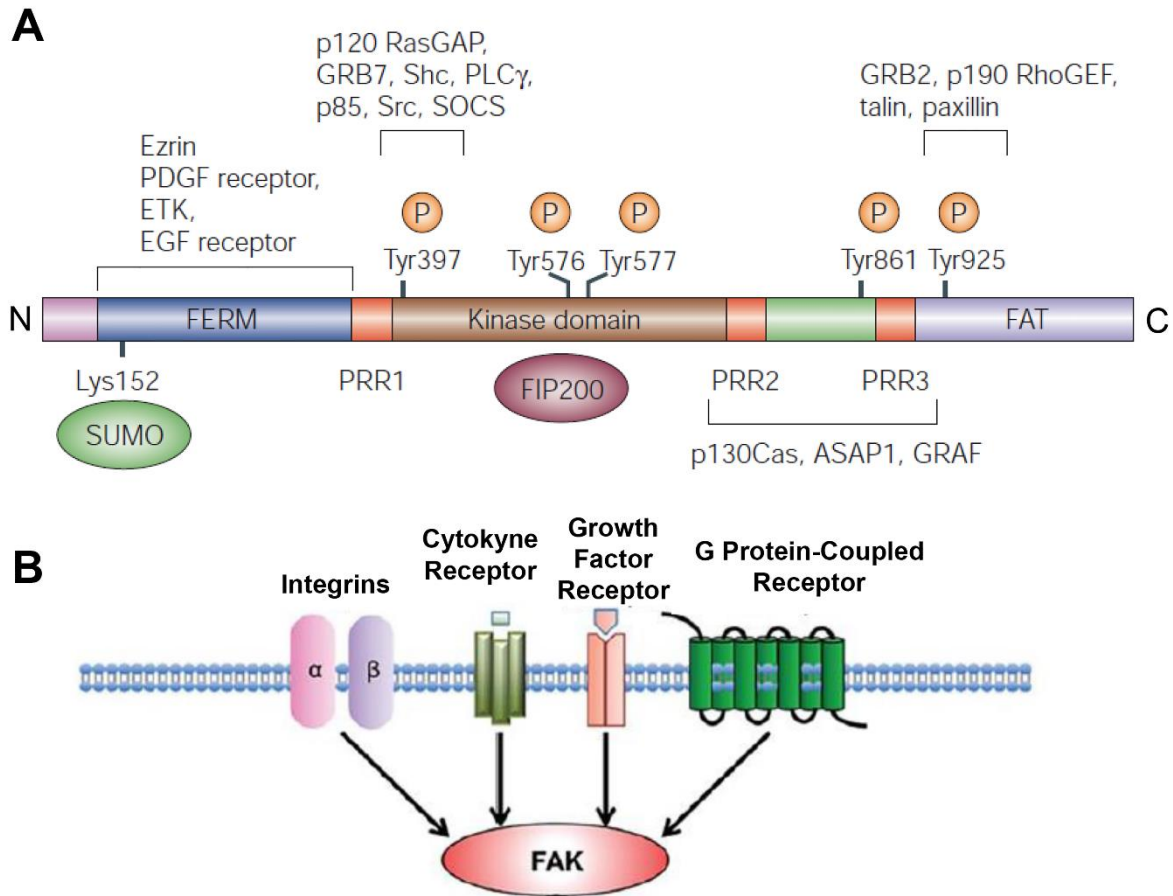


Figura 2. (A). Estructura de la cinasa de adhesión focal (FAK). (B) Activación de FAK por diferentes receptores de membrana. Tomado de Mitra *et al.*, 2005.

La cinasa FAK está sobreexpresada y sobreactivada en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de cabeza y cuello, de ovario, de próstata y de mama. Asimismo, la sobreexpresión de FAK se ha relacionado con mal pronóstico. Se propone que FAK podría ser un blanco terapéutico y están en desarrollo estrategias enfocadas a su inhibición; sin embargo, no es claro si estas estrategias deben dirigirse hacia la inhibición de la actividad cinasa de FAK o a la interrupción de interacciones cruciales proteína-proteína (Sulzmaier *et al.*, 2014).

IV. 6. Papel de las metaloproteinasas 2 y 9 en cáncer de mama

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que se clasifican en diferentes tipos, según su especificidad de sustrato y características de secuencia. Participan en varios procesos fisiológicos normales tales como embriogénesis, involución uterina y angiogénesis (Sternlicht and Werb, 2001). Sin embargo, varios estudios encontraron una sobreexpresión en diversas patologías, incluyendo el cáncer de colon, hígado, páncreas y de mama (Egeblad and Werb, 2002). En este sentido, las MMPs participan en la progresión tumoral al mediar la expansión, la angiogénesis y la invasión a través de la membrana basal (MB) y las matrices intersticiales (referencia). Concretamente, la progresión del cáncer de mama se asocia con la regulación positiva y la secreción de MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B), que tienen como diana el colágeno tipo IV, que es el componente más abundante de la MB. Estas gelatinasas son objeto de estudio como posibles marcadores tumorales y factores predictivos de metástasis en pacientes con cáncer de mama. Notablemente, la mayor expresión de estas gelatinasas en el tumor primario se asocia con una enfermedad agresiva y un resultado desfavorable. Finalmente, la ruptura de la MB por estas MMPs caracteriza el inicio del proceso invasivo de células tumorales que culminará con la metástasis a otros órganos (Sternlicht and Werb, 2001, Coussens et al., 2002, McCawley and Matrisian, 2000).

IV. 7. Vesículas extracelulares (VEs)

La comunicación celular es un proceso fundamental para la función adecuada del organismo, y en particular la comunicación celular mediada por fragmentos esféricos de membrana, denominadas vesículas extracelulares (VEs). La comunicación celular mediada por VEs ha recibido mucha atención en los últimos años debido a que regulan la fisiología normal de procesos como son: el desarrollo embrionario, el sistema inmunológico, el mantenimiento de la troncalidad celular, la cicatrización de heridas, la coagulación, la eliminación de material tóxico dentro de las células y el transporte de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos). Asimismo, tienen funciones esenciales en el desarrollo y mantenimiento de procesos patológicos, como el cáncer (Raposo and Stoorvogel, 2013).

De acuerdo a su biogénesis y tamaño, las VEs se clasifican en tres tipos: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Los exosomas se forman intracelularmente, mediante invaginación endocítica y se liberan en una estructura conocida como cuerpo multivesicular (MVB). Los cuerpos multivesiculares pueden dirigirse a los lisosomas (cuerpos multivesiculares degradativos), o alternativamente a la membrana plasmática (cuerpos multivesiculares exocíticos), donde se fusionan y liberan su contenido (las vesículas intraluminales) al espacio extracelular, donde se denominan exosomas y tienen un rango de tamaño de 30 a 100 nm. Por su parte, las microvesículas se liberan en el espacio extracelular por la gemación y fisión de la membrana plasmática y tienen un rango de tamaño que van de los 100 a 1000 nm. Mientras que los cuerpos apoptóticos corresponden a una clase de VEs

secretadas por células que entran en un programa apoptótico y tienen un tamaño de 1 a 5 μm (Gyorgy et al., 2011).

Las células eucariotas liberan poblaciones heterogéneas de VEs, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante el uso de mecanismos de secreción no convencionales, es decir, no emplean la vía de transporte secretoria clásica que requiere un péptido señal. Aunque existen estudios que señalan que estas rutas convergen en la célula. La liberación de VEs es un fenómeno fisiológico normal, que puede ser inducido por diversos estímulos exógenos como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, ionóforos de calcio, así como eventos bioquímicos como la hipoxia, acidosis y estrés celular. Varios estudios demostraron que las VEs regulan procesos fisiológicos normales, así como procesos patológicos. Pero lo más interesante o lo que las hace atractivas desde el punto de vista clínico, es su presencia en diversos fluidos biológicos, incluyendo plasma, suero, orina, fluido amniótico, saliva, leche materna y fluidos ascíticos (Xu et al., 2016).

IV. 7. 1. VEs y cáncer

La comunicación celular mediada por VEs regula muchos eventos fisiológicos normales y mantiene la homeostasis en el organismo; sin embargo, en cáncer, este proceso se encuentra perturbado. Las VEs liberadas por células cancerosas transfieren proteínas solubles y de membrana, ácidos nucleicos y una variedad de lípidos que colaboran en muchos aspectos promoviendo procesos relacionados a la progresión del tumor, tales como:

Invasión y metástasis: La invasión de la MEC es un proceso clave en la metástasis tumoral. Las VEs participan en este proceso, acarreado múltiples proteasas, incluyendo la MMP-2, MMP-9, así como sus zimógenos y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) que degradan la MEC. Concretamente, las MMPs 2 y 9 degradan el colágeno de la membrana basal (tipo IV), mientras el uPA es responsable de convertir plasminógeno a plasmina, una serin-proteasa que degrada muchos componentes de la MEC, y también activa zimógenos de MMPs. Por lo tanto, la liberación de estas enzimas a través de VEs es un mecanismo fundamental en la invasión y metástasis del cáncer (Figura 3) (Dolo et al., 1998, Tarabozetti et al., 2002, Turturici et al., 2014).

Evasión de la apoptosis: Las células tumorales emplean diferentes mecanismos para escapar de las apoptosis. Interesantemente, se demostró que las VEs derivadas de células tumorales ayudan al escape de la quimioterapia y apoptosis mediante la expulsión de drogas terapéuticas y caspasa 3, respectivamente (Figura 3) (Shedden et al., 2003, Safaei et al., 2005).

Angiogénesis: Varios estudios demostraron que las VEs derivadas de células tumorales estimulan la secreción de factores angiogénicos en células estromales, conllevando a la proliferación de células endoteliales y promoviendo angiogénesis y crecimiento tumoral. También se reportó que las VEs, además de microRNAs, contienen mRNA que codifican para factores de crecimiento como VEGF y el factor de crecimiento del hepatocito, el cual transfieren a monocitos, para inducir la producción de más factor de crecimiento, que finalmente contribuye a promover y

mantener la angiogénesis tumoral (Figura 3) (Kawamoto et al., 2012, Al-Nedawi et al., 2009, Hong et al., 2009).

Evasión del sistema inmunológico: Trabajos recientes demostraron que las células cancerosas secretan VEs que contienen al inhibidor de complemento CD46, el cual inactiva a las proteínas del complemento C4b y C3b, minimizando la inflamación del microambiente y, por tanto, evadiendo la respuesta inmune anti-tumoral. Por otra parte, las VEs derivadas de varias células cancerosas exponen al ligando de Fas (CD95L), el cual induce la apoptosis de linfocitos T, afectando la función de la respuesta inmune adaptativa (Figura 3) (Andreola et al., 2002, Huber et al., 2005, Kim et al., 2005).

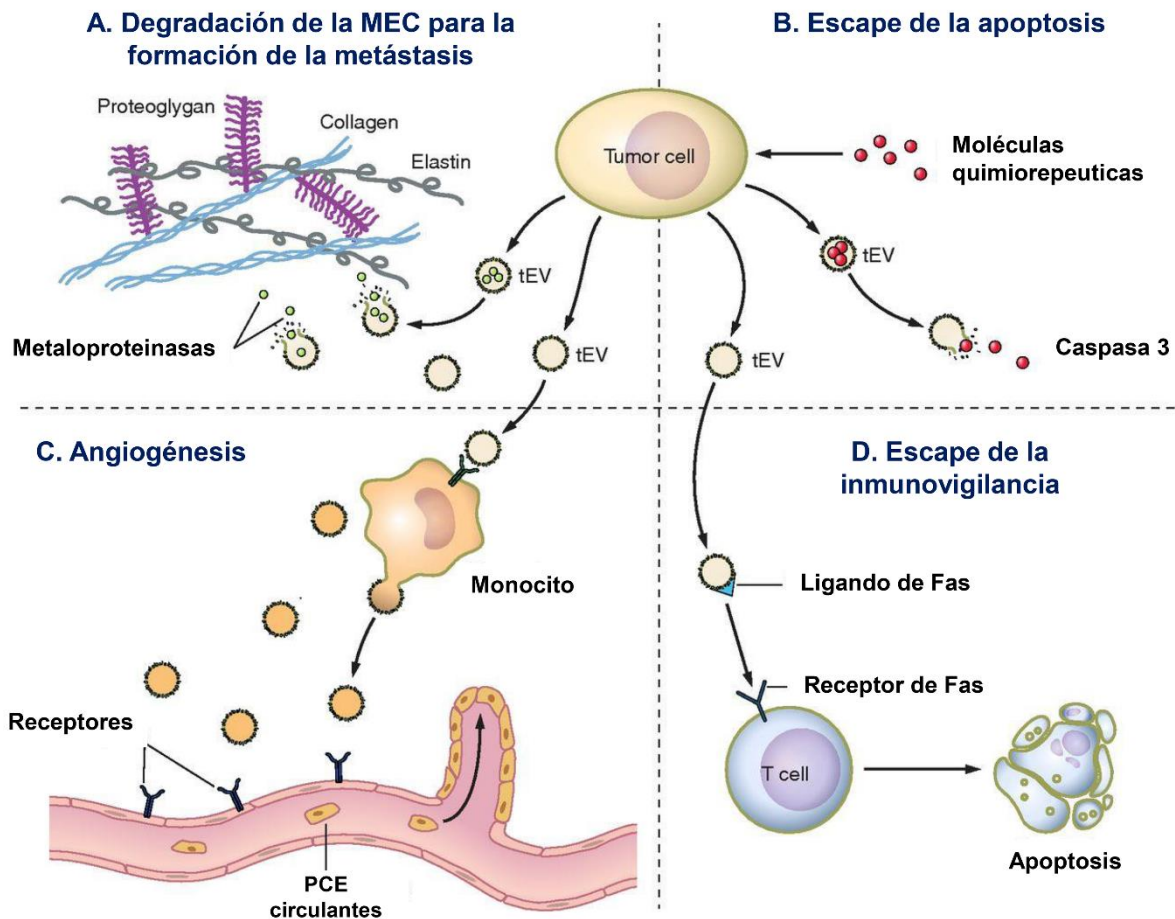


Figura 3. Participación de las VEs en la progresión del cáncer. Modificado de Turturici *et al.*, 2014.

IV. 7. 2. VEs y cáncer de mama

En el cáncer de mama, las VEs regulan eventos celulares en el inicio, en la progresión y en la metástasis. Las VEs de células tumorales mamarias transfieren sus cargos a otras células tumorales y a células del estroma, y viceversa. Por lo tanto, median la comunicación celular en el microambiente tumoral por la vía autocrina, paracrina y endocrina para regular distintos procesos, como la proliferación celular, el crecimiento, transición epitelio-mesénquima, la migración, la invasión y la sobrevivencia celular (Kanada *et al.*, 2016).

A medida que las células tumorales adoptan fenotipos inmunosupresores e invasivos, se infiltran en el tejido local y alteran la homeostasis, liberando VEs con cargos pro-tumorigénicos, que, por consiguiente, alteran la señalización de las células tumorales. Por ejemplo, las VEs de células 4T1 de cáncer de mama de ratón, promueven la proliferación y la supresión de la apoptosis de células troncales tumorales 4T1 positivas a CD133 (Shi *et al.*, 2015). Otro estudio reportó que las VEs derivadas de subclonas agresivas de la línea celular TNBC Hs578T (es decir, subclona Hs578Ts(i)) transfirieron su fenotipo agresivo a su subclona menos agresiva y a otras líneas celulares de cáncer de mama (SKRB3, MDA-MB-231, y HCC1954), así como señales proangiogénicas a células endoteliales. Además, al corroborar estos hallazgos con VEs de sueros de pacientes con cáncer de mama triple negativos, los resultados fueron los mismos (O'Brien *et al.*, 2013).

Los ácidos nucleicos, incluyendo microRNAs, se han encontrado como cargos de VEs; células MDA-MB-231 liberan VEs que contienen miR-10b y miR-1246 que promueven viabilidad, migración, invasión y resistencia a la quimioterapia de células epiteliales no tumorigénicas HMLE de mama (Singh et al., 2014, Li et al., 2017). Asimismo, los microRNAs miR-221/222, fueron encontrados regulando la expresión de genes blancos, P27 y RE α para potenciar la resistencia a tamoxifen en células de cáncer de mama positivas a RE (Wei et al., 2014).

La secreción de factores solubles (como TGF β , VEGF, etc.) mediante VEs en el microambiente tumoral alteran el medio local y afectan el fenotipo de las células circundantes, como los fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos asociados al cáncer. Estas células adquieren fenotipos pro-tumorales que en conjunto colaboran con la progresión del cáncer de mama (Cho et al., 2012). En la metástasis, las VEs regulan el tropismo selectivo de células cancerosas mamarias a órganos diana específicos. Específicamente, se demostró que las VEs son capturadas preferencialmente por las células residentes en su destino previsto para preparar el nicho pre-metastásico. Esta especificidad fue dada a través de diferentes perfiles de expresión de integrinas en las VEs, donde las integrinas $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha 6\beta 1$ se relacionaron con metástasis pulmonar, mientras que la integrina $\alpha v\beta 5$ con metástasis hepática. Una vez captadas, las VEs tumorales inducen la activación de la cinasa Src y la expresión del gen proinflamatorio S100, promoviendo cambios celulares en el órgano diana, permitiendo la colonización de células cancerosas y metástasis órgano-específico (Figura 4) (Hoshino et al., 2015). Adicional a estos hallazgos, recientemente se demostró que la integrina $\beta 3$ media la endocitosis de

las VEs con la subsecuente activación de la cinasa FAK (Fuentes et al., 2020). Asimismo, otros estudios reportaron que las VEs modulan a las células del microambiente hospedador, como las células progenitoras endoteliales, las células mesenquimales y las células derivadas de la médula ósea, por lo tanto, preparando y estableciendo el nicho pre-metastásico (Becker et al., 2016, Medeiros et al., 2020).

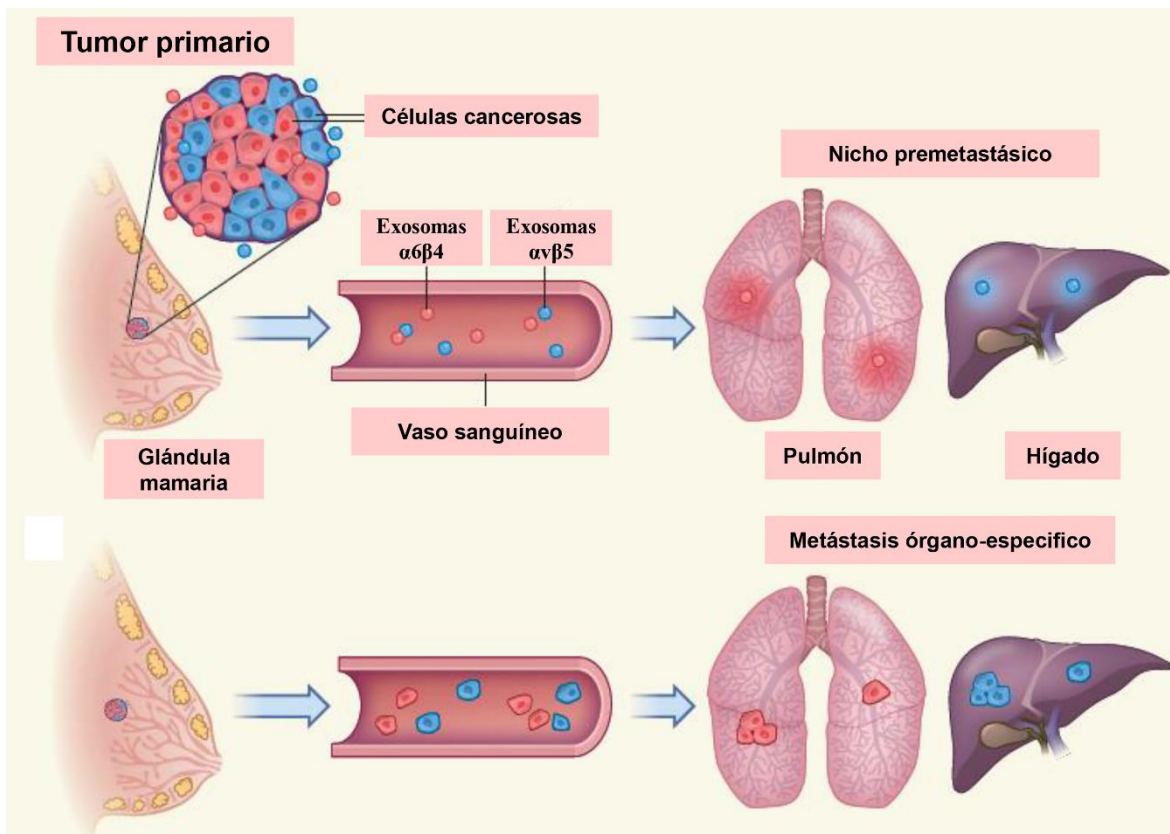


Figura 4. Las VEs dirigen la metástasis órgano-específico a través de integrinas. Modificado de Janusz Rak., 2015.

El cargo de las VEs ha sido estudiado mediante tecnologías *omics*, con el fin de que las VEs puedan ser utilizadas en la clínica como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico. Un análisis del cargo de VEs derivados de plasma de pacientes con cáncer de mama mediante proteómica, identificó 144 fosfoproteínas (entre ellas p-

Src) expresadas diferencialmente en comparación con VEs de controles sanos (Chen et al., 2017, Rontogianni et al., 2019).

Aunque las VEs tienen potencial como biopsias líquidas no invasivas para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con cáncer de mama, al igual que en otros ensayos clínicos, la aprobación de su uso requiere una secuencia de estudios, que incluyen: identificación y verificación de biomarcadores en VEs, desarrollo de ensayos clínicos de VEs, validación analítica y clínica, presentación regulatoria y utilización por el usuario final para la aplicación clínica prevista (Zhao et al., 2019).

V. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente y la principal causa de muerte asociada a neoplasias en mujeres en México y en todo el mundo. El inicio, la progresión y la metástasis de cáncer de mama son promovidos y mantenidos por factores intrínsecos de las células tumorales y por factores extrínsecos. En este contexto, la comunicación celular juega un papel fundamental, concretamente, la comunicación celular mediada por VEs participa y mantiene cada uno de las *hallmarks* del cáncer. Los factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama son variables y entre ellos destaca el estilo de vida, que incluye la dieta rica en ácidos grasos. Se han propuesto diversos modelos para tratar de comprender la manera en la que los ácidos grasos promueven el crecimiento y la progresión del tumor mamario, pero aún existen brechas importantes en el conocimiento y entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares mediados por ácidos grasos libres en las distintas etapas del cáncer de mama. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que las VEs derivadas de células cancerosas mamarias MDA-MB-231 tratadas con AL, son capaces de conferir características tumorigénicas a células epiteliales mamarias no tumorales MCF-10A. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para dilucidar el efecto de las VEs sobre las mismas células tumorales, es decir, si estas VEs son capaces de mediar procesos de migración e invasión vía autocrina o paracrina y las vías de señalización que modulan estos procesos. Asimismo, examinar el papel de las VEs de plasma de mujeres con cáncer en los procesos de migración e invasión.

VI. HIPÓTESIS

Las VEs provenientes de células MDA-MB-231 estimuladas con AL y de plasma de pacientes con cáncer mamario, promueven procesos de migración e invasión a través de las cinasas Src y FAK en las células MDA-MB-231.

VII. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de las VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL y de pacientes con cáncer mamario como mediadoras de los procesos de migración e invasión, así como el papel de las cinasas reguladoras de estos procesos.

VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar las VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con y sin AL.
- 2) Estudiar si las VEs provenientes de células MDA-MB-231 tratadas con AL promueven procesos de migración e invasión.
- 3) Analizar si las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL, promueven la activación de las cinasas Src, FAK, Akt2 y la formación de contactos focales.
- 4) Evaluar si las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen migración e invasión a través de la vía Src/FAK.
- 5) Evaluar si las VEs secretadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL estimulan la secreción de MMP-2 y MMP-9.
- 6) Determinar si las VEs provenientes de pacientes con cáncer de mama promueven procesos de migración e invasión y si estos procesos son dependientes del complejo cinasa Src/FAK en células MDA-MB-231.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

IX. 1. Materiales

El matrigel y el anticuerpo contra Flotilina-2 (Flot-2) (Monoclonal de ratón; cat. 610383; 1:1,000) fueron adquiridos en BD Biosciences. Los anticuerpos contra CD9 (Monoclonal de ratón; cat. sc-13118; 1:300), FAK D-1 (Monoclonal de ratón; cat. sc-271126; 1: 1,000), c-Src Ab 17AT28 (Monoclonal de ratón; cat. sc-130124; 1:500) y el colorante para núcleo, Hoechst fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, Inc. El anticuerpo contra CD81 EPR4244 (Monoclonal de conejo; cat. ab109201; 1:1,000) fue adquirido de Abcam. El anticuerpo fosfoespecífico para la Tyr-397 de FAK (anti-p-FAK; Policlonal de conejo; cat. no. 44-624G; IF 1:250; WB 1:1000) y el colorante de membrana CellMask™ Orange fueron obtenidos de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Inc.). El anticuerpo fosfoespecífico para la Tyr-418 de Src (anti-p-Src) fue adquirido de R&D Systems (Policlonal de conejo; cat. AF2685; 1:1,000). El anticuerpo contra vinculina (Policlonal de conejo; cat. V4139; IF 1:250; WB 1:500), Faloidina conjugado a TRITC, la mitomicina C y la anexina V fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merck KGaA). El inhibidor PP2 y su análogo inactivo PP3 fueron de Merck KGaA. El anticuerpo contra actina fue donado por el Dr. Manuel Hernández (Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN).

IX. 2. Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 fueron cultivadas en cajas de 100 mm de diámetro, con medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 3.7 g/L de bicarbonato de sodio y antibióticos. Las células fueron incubadas a 37 °C en un ambiente de 5% de CO₂ y 95% de aire hasta alcanzar 80% de confluencia.

Las células epiteliales mamarias no tumorigénicas, MCF12A, fueron cultivadas en DMEM/F12 suplementado con 5% de SFB, 0.5 µg/mL de hidrocortisona, 20 ng/mL de factor de crecimiento epidermal (EGF), 10 µg/mL de insulina y antibióticos en condiciones de 5% de CO₂ y 95% de oxígeno hasta alcanzar confluencia.

IX. 3. Pacientes

Las pacientes que se incluyeron en este estudio, consistieron de un grupo de 38 mujeres con cáncer de mama (edad promedio de 57.7 años, con rango de 38-80 años) en estadio clínico II y III de la enfermedad y sin tratamiento previo. El grupo control consistió de 30 mujeres sanas (edad promedio de 42.7 años, rango de 16-86 años), sin antecedentes y sin historia familiar de cáncer de mama. Todas las muestras fueron de pacientes que acudieron al Hospital Regional 1º de Octubre- ISSSTE. Todas las participantes firmaron la carta de consentimiento informado y los comités institucionales de ética en investigación, investigación y bioseguridad- ISSSTE aprobaron el protocolo de estudio con número de Registro Institucional 121.2016, para llevarse a efecto en colaboración entre el Hospital Regional 1º de Octubre- ISSSTE y CINVESTAV-IPN. En la tabla 1 y 2 se muestran los criterios de

inclusión y exclusión que se consideran para seleccionar al grupo control y las pacientes con cáncer de mama. Los representantes de cada institución y encargados de conducir este proyecto fueron: Dra. María del Rocío Thompson Bonilla y Dr. José Eduardo Pérez Salazar.

Tabla1	
Criterios de inclusión	
<p>Pacientes sanas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mujeres mexicanas. 2. Mujeres mayores de 18 años de edad. 3. Mujeres sin cáncer de mama u otro tipo de tumor. 4. Mujeres candidatas a cirugía estética de mama. 	<p>Pacientes con cáncer</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mujeres mexicanas. 2. Mujeres mayores de 18 años de edad con presencia de tumor en glándula mamaria. 3. Estudio de mastografía y reporte histológico. 4. Sin tratamiento previo. 5. Sin evidencia clínica de otro tumor o antecedente de la misma. 6. Que firmen carta de consentimiento informado.

Tabla 2	
Criterios de exclusión	
Pacientes sanas	Pacientes con cáncer
<ol style="list-style-type: none"> 1. Mujeres con enfermedad renal o cardiaca, así como las que presenten ingesta de fármacos que afecten el metabolismo de lípidos. 2. Embarazadas. 3. Mujeres con tratamiento de esteroides y enfermedades inmunológicas. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mujeres con enfermedad renal o cardiaca, así como las que presenten ingesta de fármacos que afecten el metabolismo de lípidos. 2. Embarazadas. 3. Mujeres con tratamiento de esteroides y enfermedades inmunológicas.

IX. 4. Estimulación con AL

Una vez que los cultivos celulares de la línea MDA-MB-231 alcanzaron confluencia de 80%, se sometieron a supresión con medio DMEM sin suero durante 24 horas. Posterior a este tiempo, los cultivos se lavaron dos veces con PBS 1X estéril (K_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, a pH 7.2). Una vez concluido este procedimiento, se les colocó medio fresco DMEM que contenía AL a una concentración de 90 μ M durante 12, 24, 36 y 48 horas. Concluida la estimulación, se recuperaron los sobrenadantes y se procedió con la purificación de VEs.

IX. 5. Aislamiento de VEs derivadas de medios condicionados de células

MDA-MB-231 tratadas o no tratadas con AL

Una vez obtenidos los medios condicionados, se sometieron a centrifugaciones consecutivas y en cada paso se recuperó el sobrenadante. En primer lugar, se centrifugó a 600xg durante 20 minutos, seguido de una centrifugación de 2,000xg durante 20 minutos, posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 10,000xg durante 30 minutos y por último a 110,000xg durante 70 minutos, con lo cual se obtuvo la pastilla enriquecida con VEs. La pastilla fue entonces resuspendida en amortiguador RIPA o en medio DMEM sin SFB y adicionado con antibióticos.

IX. 6. Enriquecimiento de VEs a partir del plasma de mujeres sanas y con cáncer de mama

Se colectaron 4 mL de sangre periférica en tubos de polipropileno que contienen citrato de sodio. Posteriormente, la sangre total fue centrifugada a 1,500 x g durante 15 minutos para obtener el plasma del cual se hicieron alícuotas y se congelaron hasta su uso. El aislamiento de VEs se llevó a cabo utilizando la técnica de centrifugación diferencial que consiste de una centrifugación inicial de 3,000xg durante 30 min. Seguido se recupera el sobrenadante y se somete a otra centrifugación de 6,000xg durante 30 min. Posteriormente se vuelve a recuperar el sobrenadante, se realiza una centrifugación de 10,000xg durante 30 minutos y finalmente se somete a una centrifugación de 110,000xg durante 70 min para obtener una fracción enriquecida con VEs. La pastilla resultante fue resuspendida en amortiguador RIPA o medio DMEM sin SFB y adicionado con antibióticos.

IX. 7. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las VEs obtenidas de medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con o sin AL, así como VEs de mujeres sanas y con cáncer de mama fueron re-suspendidas en 100 μ L de PBS filtrado y estéril. Posteriormente, 10 μ L de suspensión de VEs fueron colocadas y absorbidas durante 3-5 minutos en rejillas de cobre cubiertas con una capa de Formvar al 0.3% y estabilizadas con carbono. A continuación, las rejillas fueron expuestas durante 30 segundos sobre una gota de acetato de uranilo al 2%, el exceso de fluido fue removido utilizando papel filtro, y las rejillas se dejaron secar al aire libre. Finalmente, las rejillas fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1400) operado a 80 Kv y acoplado a una cámara digital (Olympus SIS, Germany).

IX. 8. Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

El análisis de rastreo de nanopartículas se utilizó para evaluar la distribución del tamaño de las VEs provenientes en las fracciones obtenidas. Las fracciones de VEs se diluyeron en 10 ml de PBS filtrado y se analizaron mediante el equipo de NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd.), equipado con un láser de 488 nm y una cámara sCMOS. Fueron capturados tres videos de cada muestra con una duración de 60 segundos y los datos se analizaron con el software NTA 3.0 (Malvern Instruments Ltd.).

IX. 9. Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”

Una vez que los cultivos celulares de la línea MDA-MB-231 alcanzaron confluencia de 80-90 %, éstas fueron sometidos a supresión con DMEM sin suero durante 24

horas y con la finalidad de inhibir la proliferación celular fueron tratados con mitomicina C durante 2 horas. Después de la supresión, se realizó un corte sobre la monocapa celular utilizando la punta de una pipeta estéril de 200 μ l, posteriormente los cultivos se lavaron dos veces con PBS 1X para remover las células suspendidas. A continuación, las células MDA-MB-231 fueron estimuladas durante 48 horas con las VEs derivadas de plasma de mujeres con cáncer de mama y mujeres sanas (grupo control) y con VEs de la línea MDA-MB-231 estimuladas con y sin AL. Posterior a las 48 horas de estímulo, las células fueron fijadas y teñidas con azul de Coomassie. La migración celular dentro de la herida fue fotografiada usando un microscopio invertido acoplado a una cámara.

IX. 10. Ensayos de invasión

Los insertos de placas de 24 pozos (Costar, Corning Inc.) se cubrieron con 50 μ l de Matrigel (3 mg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 2 h. A continuación, $1,2 \times 10^5$ células MDA-MB-231 en DMEM sin suero se colocaron sobre el Matrigel de cada inserto. En la parte inferior de la cámara se colocaron las fracciones de VEs (20,000 VEs/condición) en 600 μ l de DMEM sin SFB. Las placas con los insertos se incubaron a 37 °C durante 72 h en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire. Después de la incubación, se eliminaron las células que no invadieron y el matrigel en la parte superior de la membrana por medio de hisopos. Las células que invadieron y que quedaron en la superficie inferior de la membrana se lavaron con PBS, enseguida se fijaron durante 12 minutos con paraformaldehído al 4%. Las células que invadieron fueron fotografiadas y cuantificadas mediante tinción con cristal violeta al 0,5%, y posteriormente se eluyó el colorante con 300 μ l de ácido

acético al 30%. La absorbancia de la solución obtenida se midió a 600 nm. Las células tratadas con SFB al 5% se incluyeron como control de invasión.

IX. 11. Inmunodetección

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche al 5% durante 1 hora, para después colocar el anticuerpo primario correspondiente (dilución 1:1000) para su incubación durante toda la noche a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween al 0.05% y posteriormente incubadas con anticuerpo secundario especie-específico peroxidado (dilución 1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados durante 10 minutos con PBS-Tween al 0.05% y se reveló mediante quimioluminiscencia (ECL). Las autorradiografías fueron escaneadas y las bandas cuantificadas usando el programa ImageJ 1.52p (NHI).

IX. 12. Análisis de inmunofluorescencia por Microscopía Confocal

Las células MDA-MB-231 se cultivaron en cubreobjetos, fueron lavadas con PBS, equilibradas en DMEM y tratadas con fracciones de VEs (20,000 VEs/condición) durante 30 minutos. Las células se fijaron con paraformaldehído (4%), se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% y luego se bloquearon con SFB (10%) disuelto en PBS. A continuación, las células se incubaron con anticuerpo anti-p-FAK seguido de anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC (Fluoresceína-5-isotiocianato). La tinción de los contactos focales se realizó por incubación de

células con el anticuerpo anti-vinculina durante 12 horas, a 4 °C, mientras que la tinción de las células para la actina fibrilar (F-actina) se realizó por incubación con faloidina conjugada con TRITC. A continuación, las células se analizaron por microscopía confocal (Leica Microsystems; Modelo TCS SP2)

IX. 13. Zimografía en gelatina

Las células fueron estimuladas con VEs durante 24 horas, posteriormente el medio condicionado fue colectado y concentrado usando tubos “centricon” (Millipore). La actividad proteolítica de metaloproteinasas fue analizada en los sobrenadantes usando geles de poliacrilamida al 8% copolimerizados con gelatina a 1 mg/mL. Fueron mezclados volúmenes constantes de sobrenadantes (12 µL) con amortiguador de carga sin agentes reductores y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. El gel fue cargado y se realizó la electroforesis a 75 V, durante 2 horas a una temperatura de 4 °C. El gel se lavó tres veces con Tritón X-100 al 2.5% a temperatura ambiente, retirando la solución cada 30 minutos. Posteriormente el gel se incubó en amortiguador para actividad enzimática por 48 horas a 37 °C. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250) y la actividad proteolítica fue detectada como una banda clara correspondiente a la gelatina digerida, en un fondo azul de gelatina sin digerir. Como control positivo se incluyeron medios condicionados de células MDA-MB-231 tratadas con etanol a una concentración de 1.6 mg/ml para MMP-2 y PDB a una concentración de 100ng/ml para MMP-9 durante 24 horas.

IX. 14. Ensayo de proliferación

Los ensayos de proliferación fueron llevados a cabo usando el kit “Quick Cell Proliferation assay de Abcam”. Fueron sembradas 30,000 células MDA-MB-231 por pozo en una multiplaca de 96 pozos. Se estimularon con 50 μ L de medio/PBS VEs durante 48 horas en condiciones de crecimiento estándar. A continuación del tiempo de estímulo, se agregaron 10 μ L de WST-1/ECS por pozo. La placa se dejó 2-4 horas en la incubadora con CO₂. Pasado este tiempo se midió la absorbancia en un lector de ELISA dentro del rango de 420-480 nm. La medida de la absorbancia fue directamente correlacionada con el número de células viables.

IX. 15. Ensayo de tinción y captura de VEs

Las VEs se obtuvieron según el protocolo de extracción. La solución de tinción se preparó de la siguiente manera: en un tubo Falcon cubierto con aluminio, se colocó 1 μ L de solución lipofílica fluorescente CellMask™ Orange Plasma Membrane Stain (Invitrogen) en 1mL de PBS 1X estéril. A continuación, las VEs se resuspendieron en 300 μ L de solución de tinción fresca CellMask™ Orange Plasma membrane Stain, los tubos se cubrieron con papel aluminio y se dejaron incubando en hielo durante 30 min. Posteriormente, la solución de cada condición se recuperó y se colocó en tubos para ultracentrifugación (Beckman Coulter), los tubos se llenaron completamente con PBS 1X estéril. Finalmente se sometió a centrifugación de 110,000xg durante 70 minutos. Las VEs fueron recuperadas e incubadas con las células MDA-MB-231 durante 4 horas para el caso de los experimentos realizados con VEs de pacientes y durante 20 minutos para el caso de los experimentos realizados con

VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL. Finalizado el tiempo de incubación, a las células MDA-MB-231 se les retiró el medio, se lavaron con PBS-1X tres veces, y se resuspendieron en 300 μ L de PBS-1X y se analizaron por citometría de flujo, en donde se registraron 10,000 eventos por condición. El análisis fue realizado con Attune® Cytometric Software version 2.1.0.8626.

Para el caso del ensayo de captura realizado por microscopía confocal, una vez finalizado el tiempo de incubación, las células MDA-MB-231 fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, posteriormente fueron lavadas con PBS-1X dos veces. A continuación, fueron contrateñidas con el colorante Hoechst para la tinción de núcleo y finalmente se montaron sobre un portaobjeto usando Vectashield. Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal (Leica Microsystems, Model TCS SP2, Wetzlar, Germany).

IX. 16. Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres experimentos (repeticiones biológicas) independientes para cada ensayo. Los datos se analizaron usando ANOVA de una vía y la prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey usando el software SPSS Statistics versión 26 y GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, EE. UU.). Todos los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE). La probabilidad estadística por debajo de $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) y $P < 0,001$ (***) fueron consideradas estadísticamente significativas.

X. RESULTADOS

X. 1. Resultados correspondientes a VEs liberadas por las células MDA-MB-231 estimuladas con AL

X. 1. 1. Caracterización de VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con y sin AL.

La secreción de VEs es un proceso fisiológico normal que ocurre en todos los tipos celulares. Sin embargo, un número creciente de trabajos demostró que las VEs participan en procesos patológicos y además su número es elevado en medios de cultivo y en fluidos biológicos. En este trabajo estudiamos el papel de VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con y sin AL, en los procesos de migración e invasión y la activación de proteínas involucradas en estos eventos.

En primer lugar, caracterizamos tanto a las vesículas derivadas de células MDA-MB-231 sin tratamiento con AL (VEs Ctrl) y a las vesículas de células MDA-MB-231 tratadas con AL (VEs AL) mediante MET, NTA y WB. El análisis por MET y NTA mostraron VEs esféricas con tamaños que van de 50 a 539 nm para las VEs Ctrl; mientras que las VEs AL mostraron una población heterogénea con vesículas de 50 a 546 nm (Fig. 5A, B y C). El análisis por WB mostró tanto en las VEs Ctrl y VEs AL, la presencia de CD63, MHC-I y Flot-2, los cuales son marcadores asociados a VEs (Fig 5D).

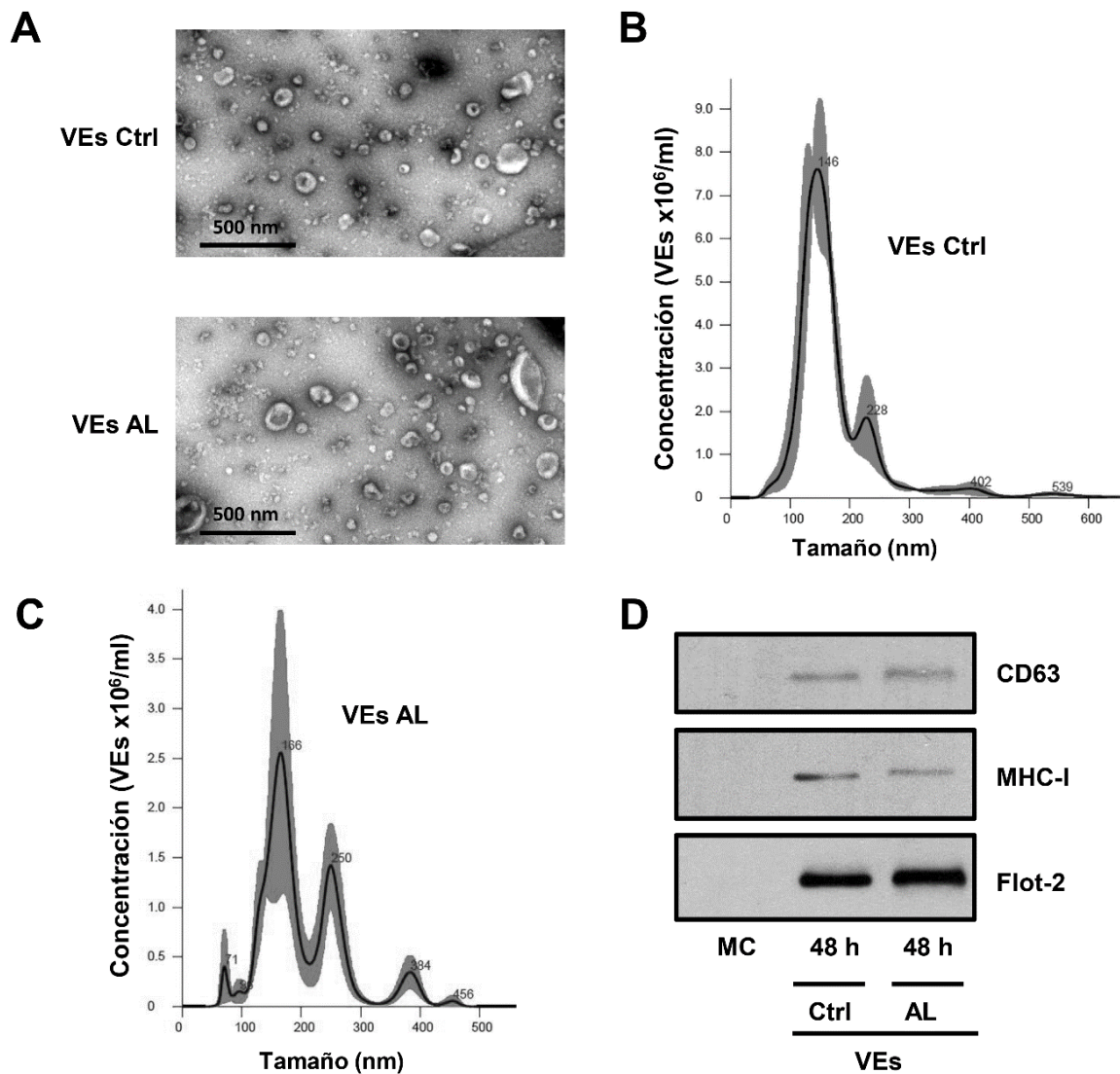


Figura 5. Caracterización de VEs liberadas de células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con AL. (A). Microscopía electrónica de transmisión de VEs teñidas mediante tinción negativa. (B y C). Análisis de rastreo de partículas de fracciones de VEs derivadas de células MDA-MB-231, sin tratar (VEs Ctrl) y tratadas con AL (VEs AL), respectivamente. (D). Análisis de marcadores de VEs mediante WB contra las proteínas CD63, MHC-I y Flot-2.

X. 1. 2. VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen migración e invasión

Con la finalidad de estudiar el papel de las VEs en los procesos de migración e invasión, cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados con 90 μM de AL durante 12, 24, 36 y 48 h. Posteriormente, los medios condicionados fueron colectados y de ellos se aislaron las VEs. Para evaluar la migración celular, utilizamos el ensayo de cierre de herida y las células MDA-MB-231 fueron tratadas con las VEs Ctrl y VEs AL. Los resultados mostraron que las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL durante 24 h, 36 h y 48 h, incrementaron la migración de las células MDA-MB-231, mientras que, las VEs Ctrl no promovieron la migración de las células MDA-MB-231 (Fig. 6A). Basados en estudios previos de nuestro laboratorio y con el actual resultado, los experimentos posteriores fueron desarrollados con VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL durante 48 h.

Otro evento relacionado con la progresión tumoral es la invasión celular. Para analizar si las VEs AL inducen invasión de células MDA-MB-231, empleamos ensayos de invasión en cámaras de Boyden recubiertas con matrigel. Los resultados mostraron que únicamente las VEs AL son capaces de potenciar la invasión de células MDA-MB-231 (Fig. 6B).

Debido a que la invasión involucra la secreción de metaloproteinasas de matriz, incluyendo la MMP-2 y la MMP-9, evaluamos si las VEs AL son capaces de incrementar la secreción de estas metaloproteinasas en células MDA-MB-231. Para este fin, colectamos medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas

durante 6, 9, 12, 18 y/o 24 h con VEs Ctrl y VEs AL. Posteriormente estos medios condicionados fueron analizados mediante zimografía. Los resultados obtenidos mostraron que las células sin estímulo y estimuladas con VEs Ctrl secretan niveles basales de MMP-2 y MMP-9, pero el estímulo con VEs AL potenció la secreción de MMP-9 (Fig. 6C).

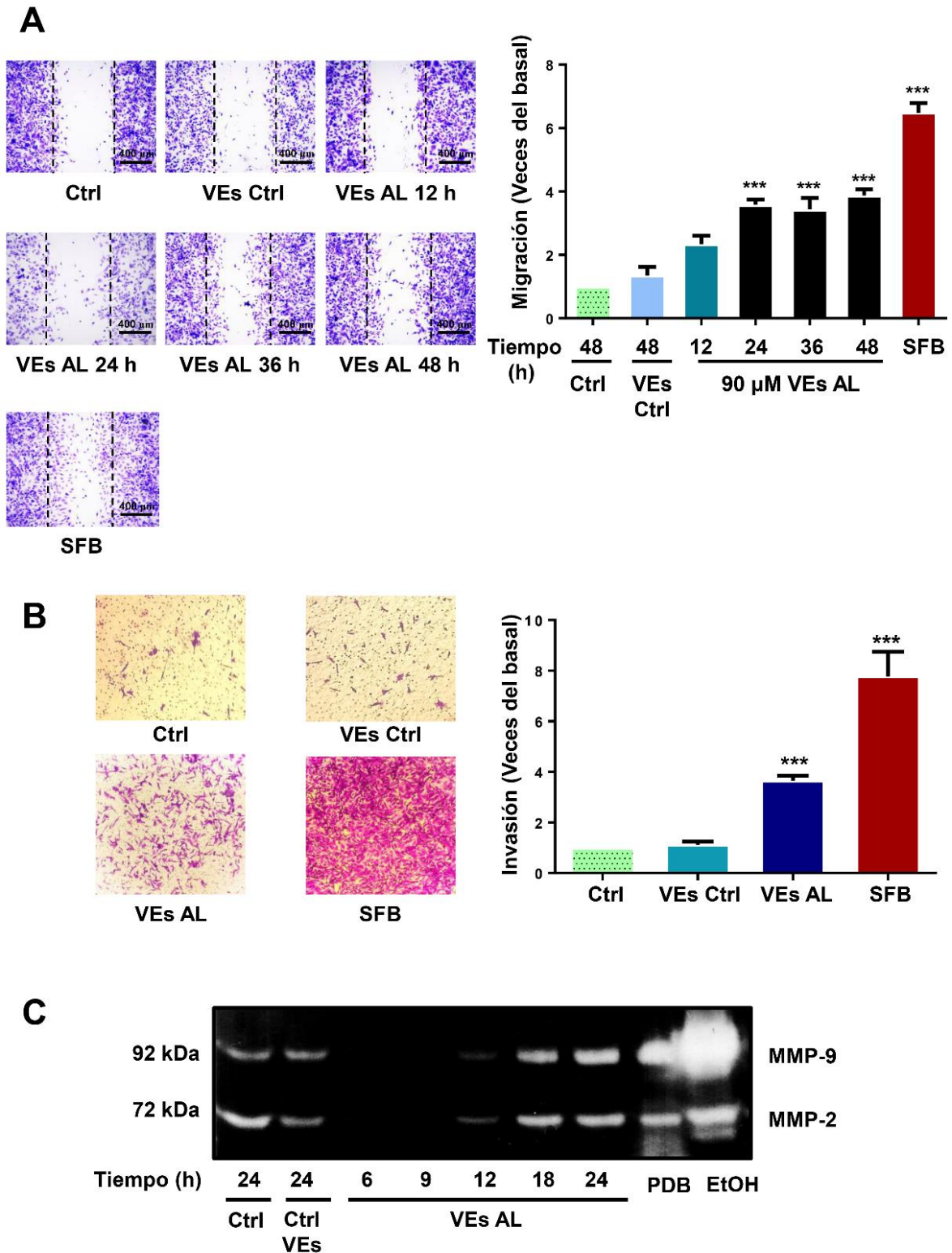


Figura 6. VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL incrementan la migración e invasión celular. (A). Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron pre-tratadas con 12 μ M de mitomicina C durante 2 horas. Posteriormente se les realizó una rayadura sobre la monocapa

utilizando una punta estéril de 200 μ l. A continuación, las células fueron tratadas con VEs provenientes de células MDA-MB-231 tratadas con 90 μ M de AL durante 12, 24, 36 y 48 h. Fue incluida una condición sin tratamiento con AL (VEs Ctrl). **(B)**. La invasión celular fue analizada utilizando cámaras de Boyden recubiertas con matrigel. Las células MDA-MB-231 se estimularon con VEs Ctrl y VEs AL durante 72 h. Fue añadido un control negativo, que consistió de células sin estímulo y como control positivo células tratadas con SFB. **(C)**. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron tratados con VEs Ctrl y VEs AL a diferentes tiempos, posteriormente el medio condicionado fue colectado y concentrado por centrifugación. La secreción de MMP-2 y MMP-9 se realizó por zimografía. Como control positivo se incluyeron medios condicionados de células MDA-MB-231 tratadas con etanol a una concentración de 1.6 mg/ml para MMP-2 y PDB a una concentración de 100ng/ml para MMP-9, durante 24 horas. Los asteriscos representan resultados significativamente diferentes contra VEs Ctrl. *** P <0,001.

X. 1. 3. VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la activación de Src, FAK y Akt2.

El incremento de la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales es resultado de la activación aberrante de proteínas claves en estos procesos, incluyendo las proteínas Src, FAK y Akt. Por lo tanto, en este estudio determinamos si la estimulación de células MDA-MB-231 con VEs AL induce la activación de las cinasas Src, FAK y Akt2, lo cual se detectó por la fosforilación de sus residuos de Tyr418, Tyr397 y Ser474, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que las VEs AL inducen la fosforilación de Src, FAK y Akt2. Notablemente, el pico máximo de activación para las tres proteínas se observó en los tiempos de 20 y 30 minutos (Fig. 7A, B y C).

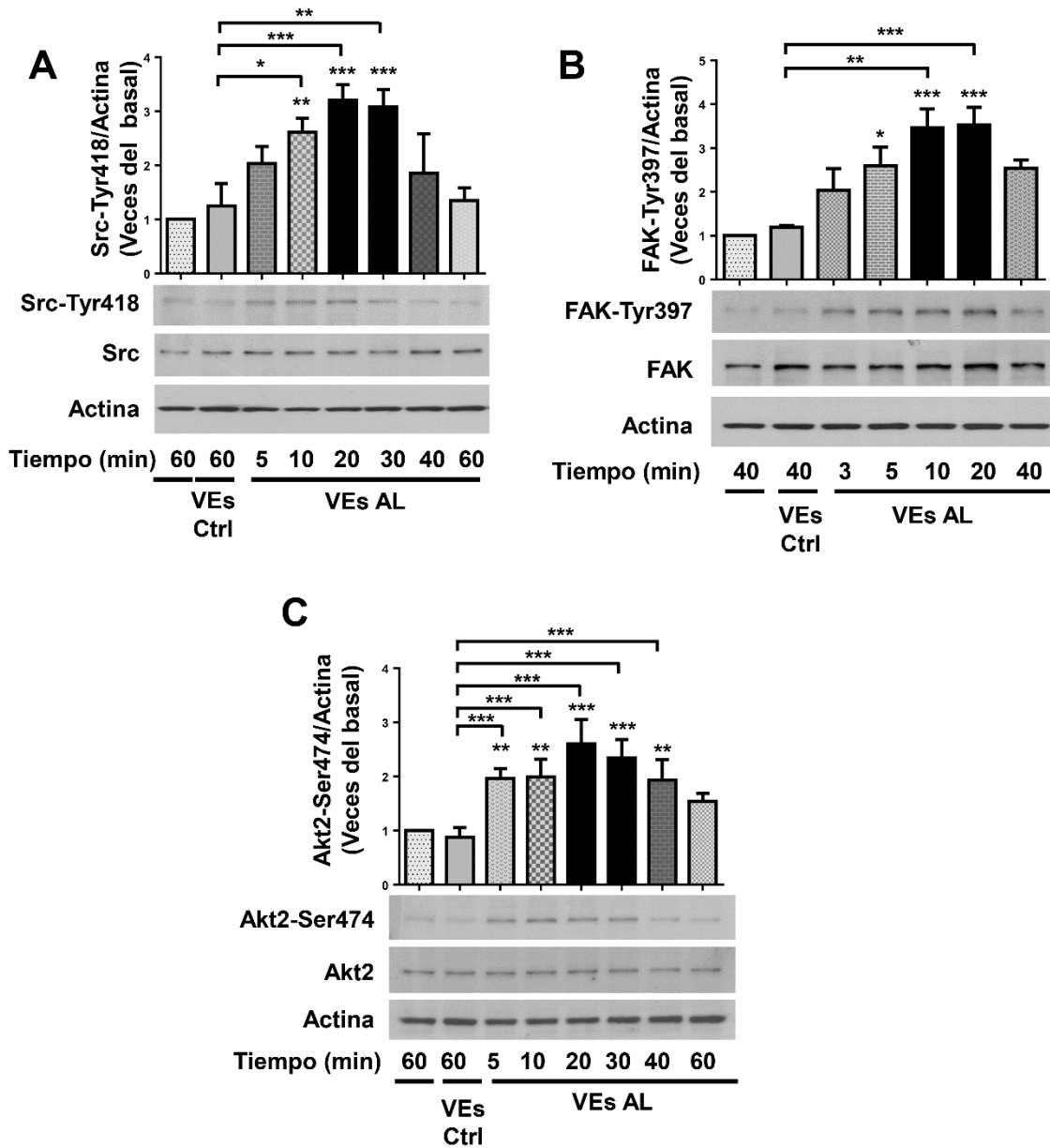


Figura 7. Las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la activación de Src, FAK y Akt2. (A y B). Lisados de células MDA-MB-231 estimuladas durante varios períodos de tiempo con VEs Ctrl y VEs AL fueron analizados mediante WB utilizando anticuerpos específicos anti-p-FAK-Tyr397 y anti-p-Src-Tyr418. Las membranas se analizaron adicionalmente con anti-Src, anti FAK y anti-actina como controles de carga. **(C).** Los lisados de células MDA-MB-231 estimuladas durante varios períodos de tiempo con VEs Ctrl y VEs AL se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Akt2, y los inmunoprecipitados se analizaron mediante WB con un anticuerpo anti-p-Akt-Ser474. Las membranas se probaron adicionalmente con un anticuerpo anti-Akt2 y anti-actina como controles de carga. Los valores de p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397 y p-Akt2-Ser474 se normalizaron al control de carga, actina. Los gráficos representan las medias \pm DE e indican los cambios de veces de p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397 y p-Akt2-Ser474 por encima de los valores de VEs Ctrl. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra el VEs Ctrl. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

X. 1. 4. VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la formación de contactos focales.

Para estudiar si la estimulación de células MDA-MB-231 con VEs AL induce la formación de contactos focales, cultivamos células MDA-MB-231 sobre cubreobjetos, posteriormente fueron estimuladas con VEs Ctrl y VEs AL. La formación de contactos focales fue analizada usando inmunofluorescencia con anticuerpo anti-p-FAK (Tyr397), debido a que FAK fosforilada es un marcador de contactos focales porque reside en dichas estructuras, donde modula distintos eventos de señalización. Los resultados indicaron que en condición basal no hubo formación de contactos focales, mientras que el estímulo con las VEs Ctrl indujo un ligero incremento en el ensamblaje de adhesiones focales. En contraste, el estímulo con VEs AL indujo un gran incremento en el ensamblaje de contactos focales (Fig. 8).

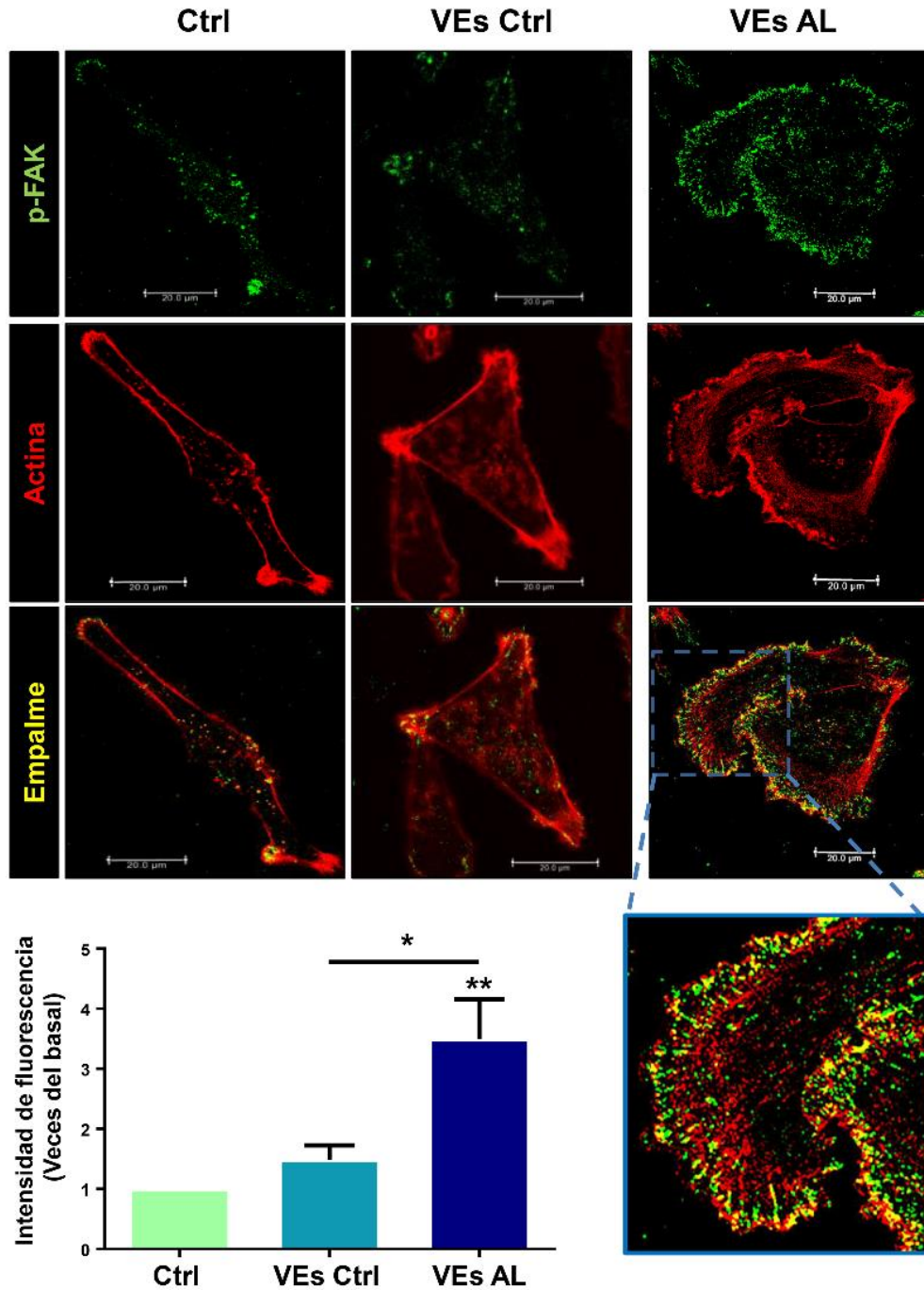


Figura 8. Las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen el ensamblaje de adhesiones focales. Cultivos de células MDA-MB-231 se estimularon durante 30 min con las VEs Ctrl y VEs AL. Finalizado el tiempo de estímulo, las células se incubaron con anticuerpo anti-p-FAK-Tyr397 toda la noche, posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario y faloidina rodaminada. Las muestras se examinaron usando microscopía confocal. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. Los datos se presentan como la media \pm DE de la intensidad media de fluorescencia de p-FAK-Tyr397 y los valores expresan el número de veces por encima del VEs Ctrl. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

X. 1. 5. Las VEs secretadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la activación de FAK y Akt2 a través de una vía dependiente e independiente de Src, respectivamente

Con el fin de analizar si la activación de FAK y Akt2 depende de la actividad de Src, usamos un inhibidor selectivo para los miembros de la familia de Src, denominado PP2. Como se muestra en la figura 9A, B y C, el pre-tratamiento con el inhibidor PP2, inhibe significativamente la activación de Src y de FAK, mientras que PP2 no inhibe la fosforilación de Akt2 en Ser474 en las células MDA-MB-231 (Fig. 9D).

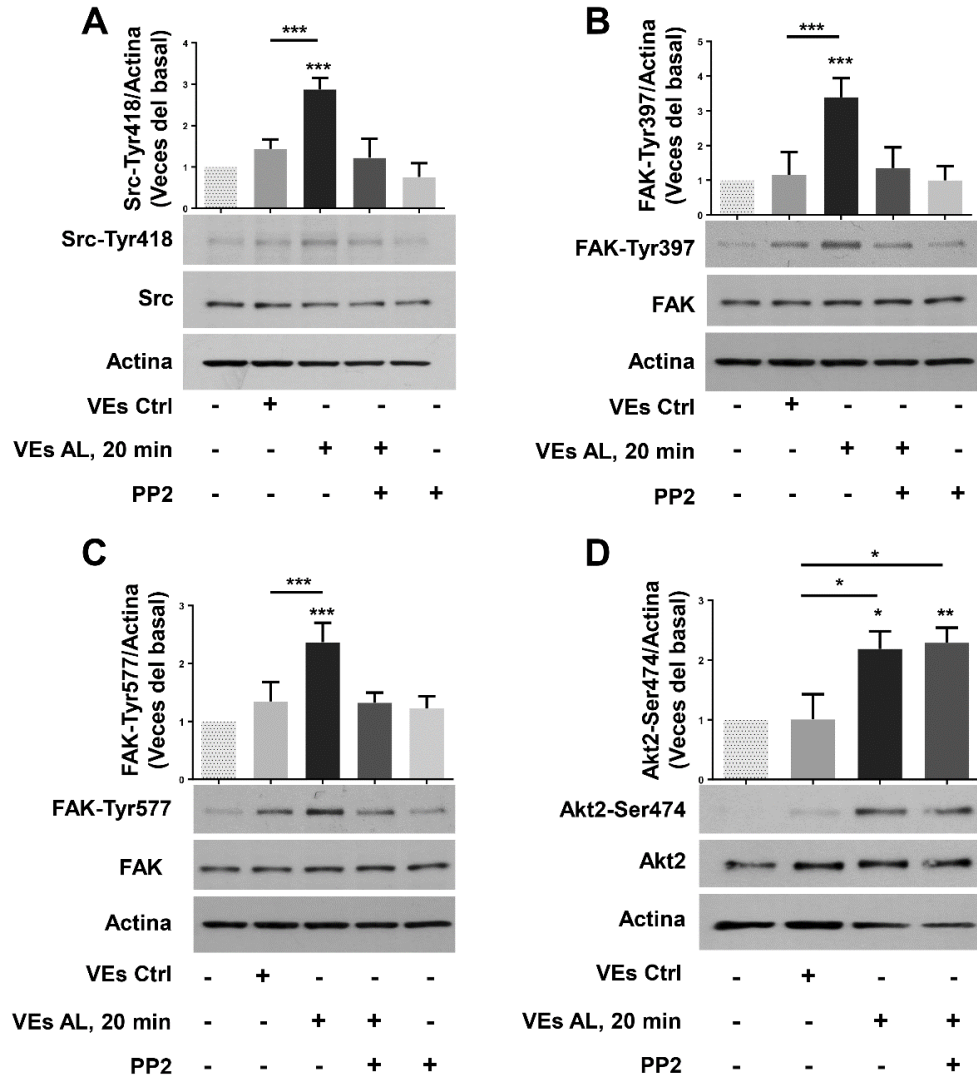


Figura 9. Participación de Src en la activación de FAK y Akt2 inducida por VEs secretadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL. (A, B y C). Lisados de células MDA-MB-231 pre-tratadas con 10 μ M de PP2 durante 1 hora y estimuladas con VEs Ctrl y VEs AL durante 20 min fueron analizadas mediante WB utilizando anticuerpos contra p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397 y p-FAK - Tyr577. Las membranas de nitrocelulosa se analizaron adicionalmente con anticuerpos anti-Src, anti-FAK y anti-actina (controles de carga). **D.** Lisados de células MDA-MB-231 pre-tratadas durante 1 h con PP2 10 μ M y tratados con VEs Ctrl y VEs AL durante 20 min fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-Akt2; posteriormente, los inmunoprecipitados se analizaron mediante WB con un anticuerpo anti-p-Akt-Ser474. Las membranas se probaron adicionalmente con anticuerpo anti-Akt2 y anti-actina como controles de carga. Los valores de p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397, p-FAK-Tyr577 y p-Akt2-Ser474 se normalizaron al control de carga, actina. Los gráficos representan las medias \pm DE e indican el número de veces de p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397, p-FAKTyr577 y p-Akt2-Ser474 por encima de los valores de VEs Ctrl. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra las VEs Ctrl. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001.

X. 1. 6. VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración e invasión a través de una vía dependiente de la actividad de Src

Con el fin de estudiar el papel de Src en la migración e invasión mediada por las VEs AL, las células MDA-MB-231 fueron pre-tratadas con y sin PP2. Posteriormente se estimularon con VEs AL; mediante el ensayo de cierre de herida y ensayo de invasión por cámaras de Boyden, evaluamos la capacidad migratoria e invasiva de las células MDA-MB-231. Los resultados mostraron que el tratamiento con el inhibidor PP2 inhibe la migración e invasión inducida por las VEs AL (Fig. 10A y B).

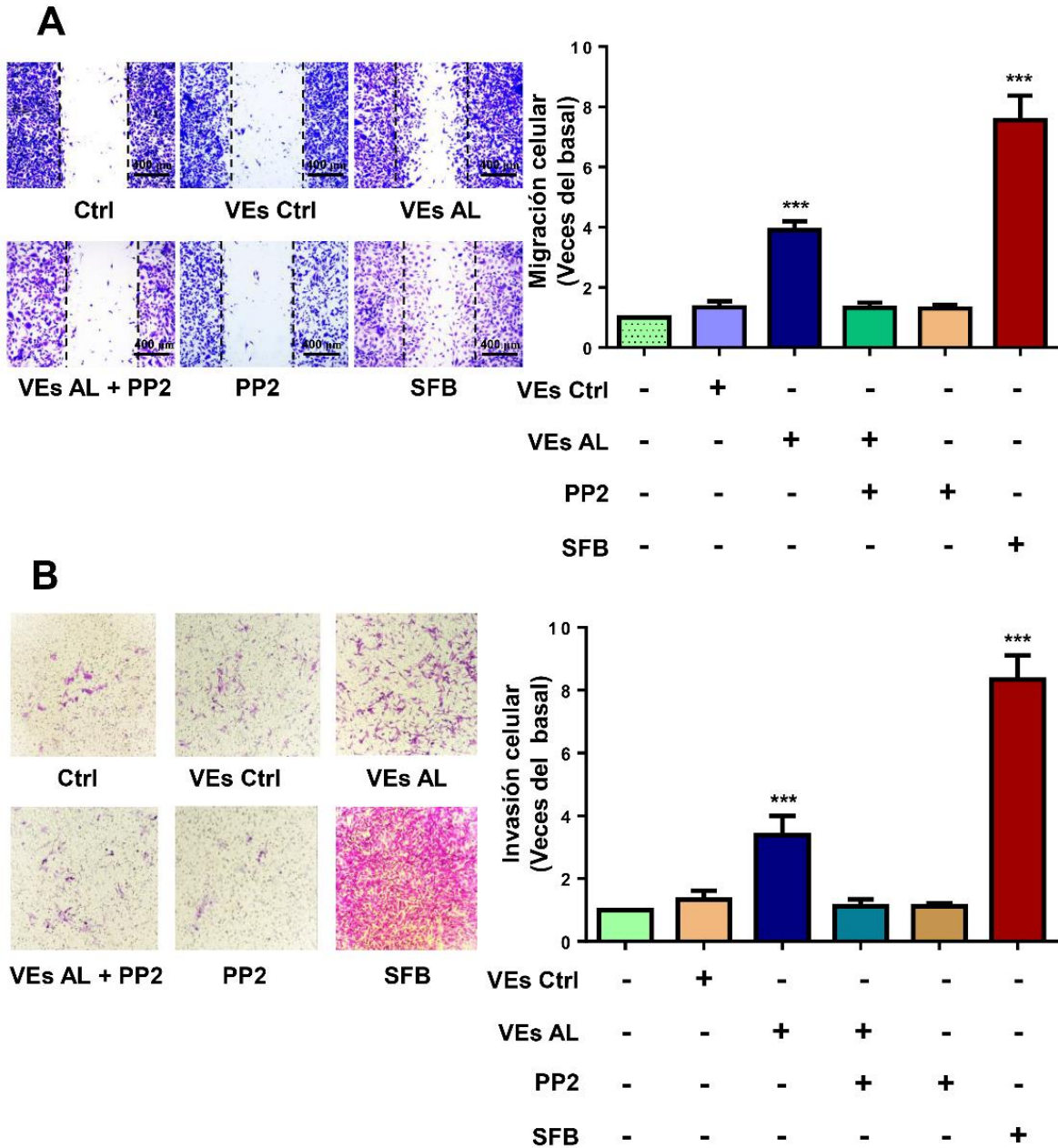


Figura 10. Las VEs secretadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL promueven la migración e invasión a través de una vía dependiente de la actividad de Src. (A y B). Los ensayos de migración e invasión se realizaron con células MDA-MB-231 tratadas durante 1 h con 10 μ M de PP2 y estimuladas con VEs Ctrl y VEs AL. Los gráficos representan las medias \pm DE e indican las veces del incremento de la migración o invasión con respecto al valor de VEs Ctrl. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra las VEs Ctrl. *** P < 0,001.

X. 1. 7. Las células MDA-MB-231 capturan las VEs liberadas por células MDA-MB-231 con y sin tratamiento con AL.

Para estudiar si las células MDA-MB-231 capturan las VEs Ctrl, VEs AL y además evaluar el papel de Src en la captura, las VEs Ctrl y VEs AL fueron teñidas con un colorante fluorescente denominado "CellMask Orange". Posteriormente, las células MDA-MB-231 pre-tratadas con y sin PP2, se incubaron con VEs teñidas durante 20 minutos. Pasado el tiempo de incubación la intensidad media de fluorescencia de las células MDA-MB231 fue analizada usando citometría de flujo y microscopía confocal. Los resultados revelaron que las células MDA-MB-231 tratadas con VEs Ctrl y VEs AL teñidas presentaron un incremento en la intensidad media de fluorescencia con respecto a las células que no recibieron tratamiento o que fueron tratadas con VEs sin teñir (Fig. 11A y B). Así mismo, encontramos que no hay diferencias en la captura de VEs Ctrl y VEs AL, y el tratamiento con PP2 no afecta la captura de las VEs AL (Fig. 11A y B).

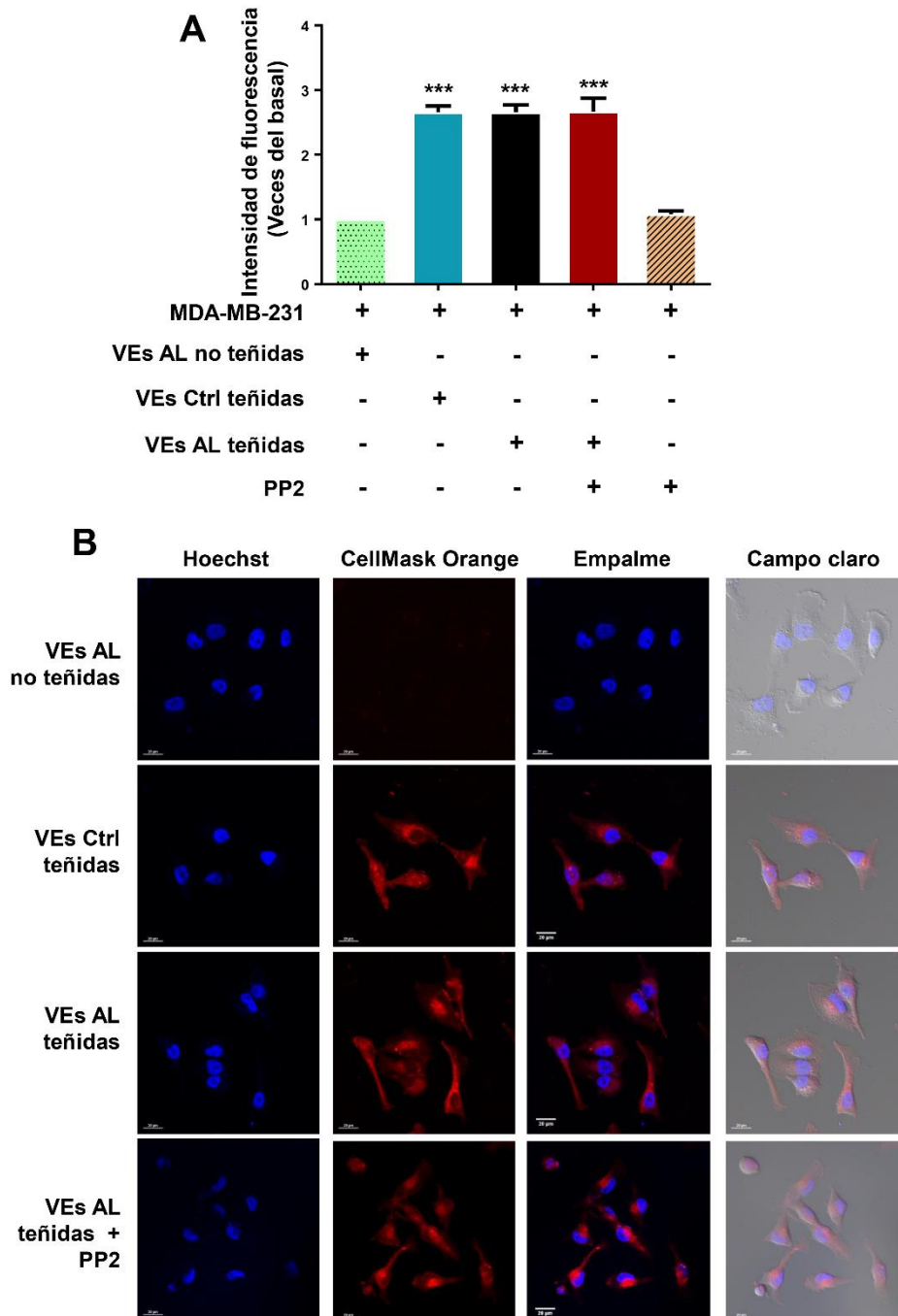


Figura 11. Las células MDA-MB-231 capturan VEs de células tratadas y no tratadas con AL. (A). Células MDA-MB-231 tratadas durante 1 h con 10 μ M de PP2 y estimuladas con VEs AL sin teñir, VEs Ctrl teñidas y VEs AL teñidas fueron analizadas por citometría de flujo. El gráfico representa las intensidades medias de fluorescencia \pm DE e indica el número de veces de incremento de la intensidad de fluorescencia con respecto a las VEs AL sin teñir. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra las VEs AL sin teñir. *** $P < 0,001$. (B). Análisis por microscopía confocal de células MDA-MB-231 tratadas durante 1 h con PP2 10 μ M e incubadas con VEs AL sin teñir, VEs Ctrl teñidas y VEs AL teñidas. Los núcleos se tiñeron con el colorante Hoechst. Barra de escala = 40 μ m.

X. 2. Resultados con vesículas derivadas de pacientes con cáncer de mama

X. 2. 1. Las VEs de plasma de mujeres con cáncer de mama inducen migración de células MDA-MB-231.

La comunicación celular mediada por VEs llamó la atención de muchos investigadores alrededor del mundo, principalmente, por su papel en la modulación de diferentes procesos celulares relacionados con el inicio, la progresión y metástasis tumoral. Asimismo, las VEs son candidatos potenciales como marcador de pronóstico de muchas enfermedades debido a su presencia en fluidos biológicos, incluyendo plasma, suero, saliva, orina, líquido amniótico y leche materna. En el presente estudio obtuvimos VEs de plasma de mujeres con cáncer de mama y evaluamos su papel en migración e invasión de células tumorales MDA-MB-231. En primer lugar, realizamos la caracterización de las fracciones de VEs usando NTA, MET y WB. Los resultados obtenidos por NTA y MET identificaron una población de vesículas esféricas con tamaños entre 30-300 nm en las fracciones de VEs de plasma de mujeres sanas, mientras que las fracciones de VEs de plasma de mujeres con cáncer de mama presentaron vesículas entre 50-600 nm (Fig. 12A y B). Además, el análisis por NTA mostró que el número de VEs fue significativamente mayor en mujeres con cáncer de mama (1.542×10^{11} VEs/mL) comparadas con mujeres sanas (2.14×10^{10} VEs/mL). Los resultados de WB demostraron la expresión de proteínas como flotilina-2, CD9 y CD81 en fracciones de VEs de mujeres sanas (VEs Ctrl) y fracciones de VEs de mujeres con cáncer de mama (VEs CM; Fig. 12C).

Posteriormente, se investigó si las VEs CM inducen migración en células MDA-MB-231. Para analizar esto, se realizaron ensayos de migración por cierre de herida y las células MDA-MB-231 fueron tratadas con VEs obtenidas de plasma de 15 mujeres sanas que se utilizaron como grupo control y de 22 muestras de pacientes con cáncer de mama. Los resultados indicaron que las VEs CM indujeron una mayor migración en comparación con las VEs Ctrl (Fig. 12D). Además, se analizó la asociación entre la migración inducida por VEs CM en las células MDA-MB-231 y los niveles de expresión de los receptores de estrógeno, progesterona y Her2/neu en los tumores mamarios de las mujeres de donde se obtuvieron las VEs. Los resultados mostraron que la migración inducida por VEs CM no correlaciona con los niveles de expresión de los receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) y Her2/neu (Fig. 12E). Además, la migración de las células MDA-MB-231 inducidas por VEs CM no se asocia con el estadio clínico II y III de las mujeres con cáncer de mama (Fig. 12F).

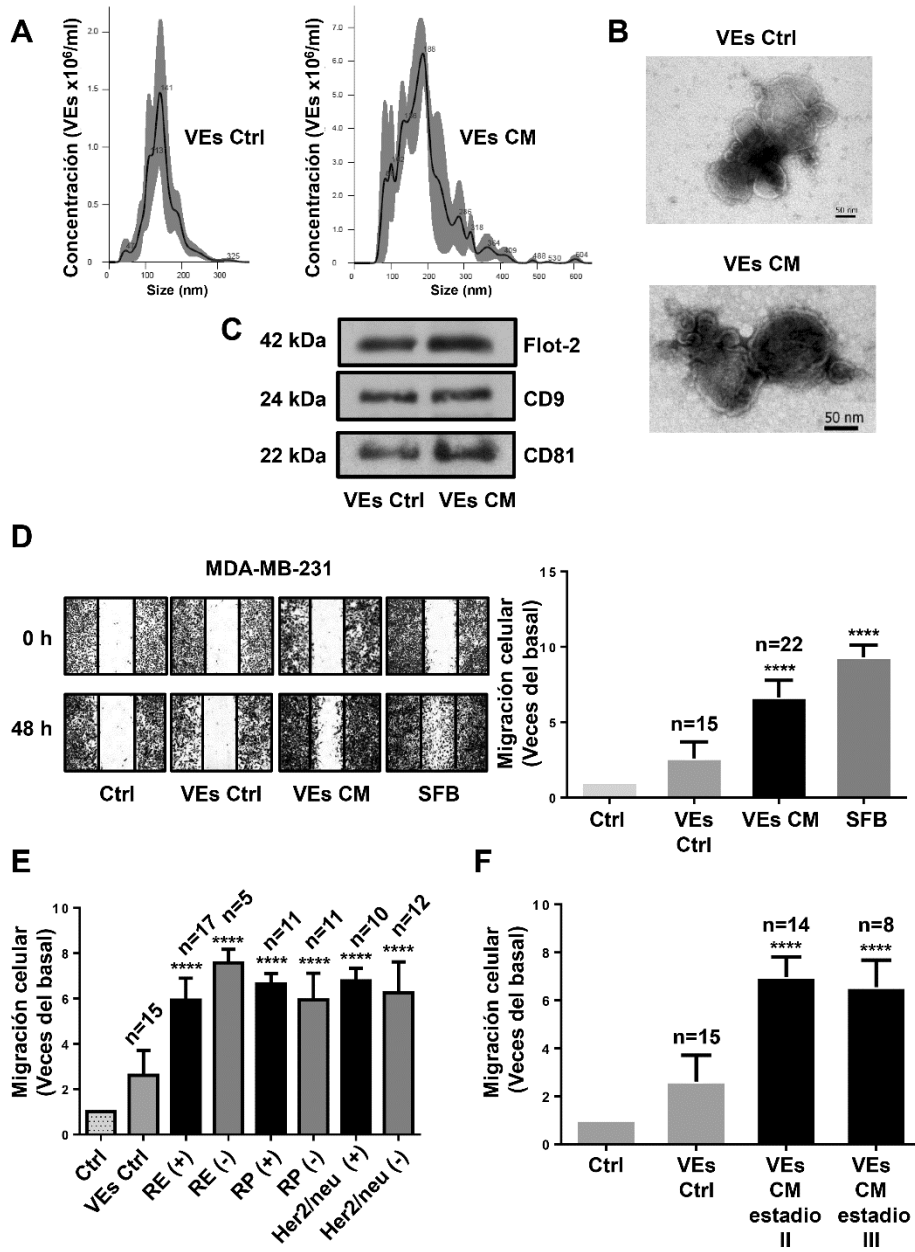


Figura 12. Las VEs de plasma de pacientes con cáncer de mama incrementan la migración de células MDA-MB-231. (A) Se analizaron las VEs Ctrl y VEs CM mediante NTA. La distribución de tamaño calculado de las partículas se representó como la media (línea negra) con errores estándar (área sombreada en gris). (B) Las VEs Ctrl y VEs CM se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión. (C) Análisis de las VEs Ctrl y VEs CM por Western Blot utilizando anticuerpos anti-Flot-2, anti-CD9 y anti-CD81. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (D) Ensayos de cierre de herida. Las células MDA-MB-231 tratadas durante 48 h con VEs Ctrl y VEs CM. (E) Análisis de la migración inducida por VEs CM en relación con la expresión de RE, RP y Her2/neu. (F) Análisis de la migración inducida por VEs CM en relación con el estadio clínico de los pacientes. Los datos se presentan como la media \pm DE y los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra el Ctrl. *** P < 0.001, **** P < 0.0001. n=número de muestras analizadas.

Para examinar si estos hallazgos son producidos en otras células, se analizó si las VEs CM eran capaces de inducir migración e invasión en una línea celular de cáncer de mama positiva a receptores (MCF-7) y en células epiteliales no tumorigénicas mamarias (MCF12A). Los resultados mostraron que el tratamiento con VEs CM no indujo la migración en las células MCF-7 y tampoco indujo la migración ni la invasión de células MCF12A (Fig. 13A-C).

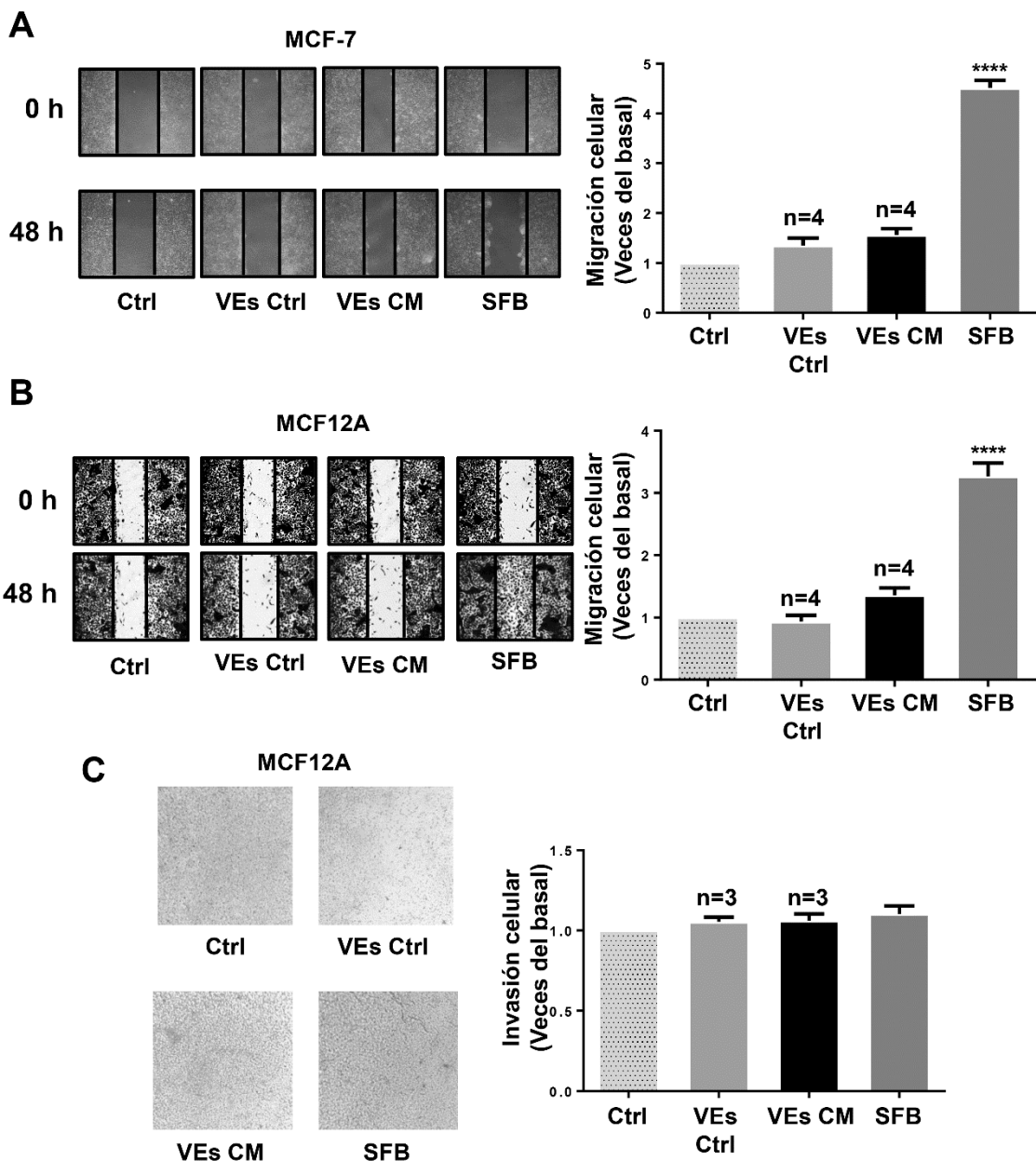


Figura 13. Las VEs del plasma de pacientes con cáncer de mama no promueven la migración ni la invasión de células MCF-7 y MCF12A. (A y B) Ensayos de cierre de herida. Cultivos confluentes de células MCF-7 y MCF12A fueron tratados durante 48 h con VEs Ctrl y VEs CM. (C) Los ensayos de invasión se realizaron con células MCF12A tratadas con VEs Ctrl y VEs CM. Se incluyó un control positivo, que consistió de células estimuladas con SFB. Los datos se presentan como la media \pm DE. Los asteriscos indican el incremento significativo con respecto a la migración o invasión del Ctrl. *** P <0.001. n=número de muestras analizadas.

X. 2. 2. Las células MDA-MB-231 capturan las VEs de mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama.

Debido a que los resultados previos mostraron que únicamente las VEs CM potenciaron la migración, se decidió estudiar si las células MDA-MB-231 capturan tanto las VEs Ctrl y VEs CM. Para probar esto, las VEs Ctrl y VEs CM se tiñeron con un colorante fluorescente llamado CellMask, y las células MDA-MB-231 se incubaron con VEs teñidas y VEs no teñidas. Posteriormente, la intensidad media de fluorescencia de las células se analizó por citometría de flujo. Se identificó que la intensidad de fluorescencia fue mayor en las células MDA-MB-231 tratadas con VEs Ctrl y VEs CM teñidas en comparación con las células MDA-MB-231 tratadas con VEs no teñidas (Fig. 14A y B). Además, la intensidad de fluorescencia no fue significativamente diferente entre el valor obtenido de las células MDA-MB-231 tratadas con VEs CM teñidas y el valor obtenido de las células MDA-MB-231 tratadas con VEs Ctrl teñidas (Fig. 14C).

Las VEs expresan fosfatidilserina (PS) en su superficie, y la anexina V (Anx V) tiene una afinidad fuerte y específica por PS. Por tal razón, en el experimento ya descrito, se incluyeron controles de inhibición de la captura y mediante el tratamiento de VEs con 200 ng/ml de Anx V, previo a la tinción de las VEs con el colorante CellMask

Orange. Los resultados indicaron que el tratamiento de las VEs Ctrl teñidas, con Anx V, disminuyó el aumento de la intensidad media de fluorescencia de células MDA-MB-231 tratadas con VEs Ctrl teñidas (Fig. 14A). Sin embargo, el tratamiento de las VEs CM teñidas con Anx V, no inhibió el aumento de la intensidad media de fluorescencia de células MDA-MB-231 tratadas con VEs CM teñidas (Fig. 14B).

Para sustentar si las células de cáncer de mama MDA-MB-231 captan tanto las VEs de mujeres sanas y de pacientes con cáncer de mama, se realizaron ensayos de captura por microscopía confocal. Los resultados obtenidos reafirmaron que tanto las VEs Ctrl, así como las VEs CM son capturadas por las células MDA-MB-231 (Fig. 14D).

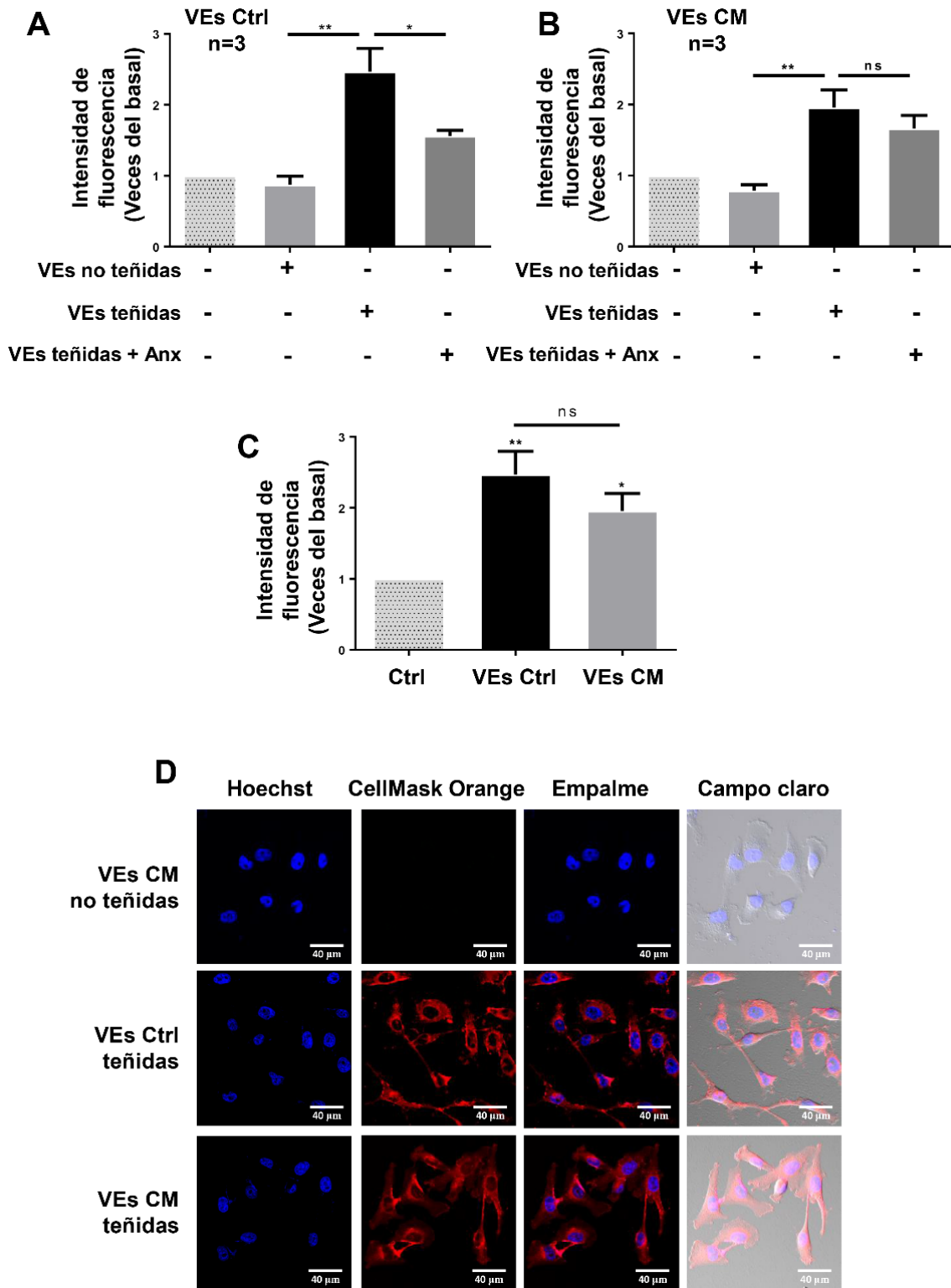


Figura 14. Las VEs de plasma de mujeres sanas y con cáncer de mama son capturadas por las células MDA-MB-231. (A y B) Análisis de citometría de flujo de células MDA-MB-231 incubadas con VEs Ctrl sin teñir o teñidas y VEs CM sin teñir o teñidas. Como controles, se incluyeron células

sin tratamiento con VEs y la inhibición de la captura (anexina V). **(C)** Comparación de la captura de VEs teñidas entre las células MDA-MB-231 tratadas con VEs CM y VEs Ctrl. **(D)** Microscopía confocal de células MDA-MB-231 incubadas con VEs CM no teñidas, VEs Ctrl teñidas, VEs CM teñidas. El núcleo se tiñó con el colorante Hoechst. Barra de escala, 40 μ m. Las gráficas representan las intensidades medias de fluorescencia \pm DE, y los asteriscos indican resultados significativamente diferentes al Ctrl y VEs Ctrl. * P <0.05, ** P <0.01. ns, no significativo. n=número de muestras analizadas.

X. 2. 3. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la secreción de gelatinasas.

La secreción de gelatinasas de matriz es una característica típica de las células tumorales de mama, por lo que se estudió si las VEs CM son capaces de inducir la secreción de las gelatinasas tipo A y tipo B. Para este fin, las células MDA-MB-231 fueron tratadas durante 3, 6, 9, 12 y 24 h con VEs de tres pacientes con cáncer de mama. Asimismo, se incluyó una condición control que consistió en estimular células MDA-MB-231 durante 24 h con VEs de tres mujeres sanas. Pasado el tiempo de estímulo, se obtuvieron los medios condicionados, fueron concentrados y analizados por zimografía en gelatina. Se identificó que la estimulación de las células MDA-MB-231 con VEs CM indujo una mayor secreción de MMP-2 y MMP-9 a las 12 y 24 h de tratamiento (Fig. 15A).

A partir de las observaciones anteriores, a continuación, estimulamos células MDA-MB-231 con VEs CM a un tiempo fijo de 24 h. Se trataron las células MDA-MB-231 con VEs de tres mujeres sanas y de tres pacientes con cáncer de mama. El análisis por zimograma reveló que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con VEs Ctrl indujo un nivel bajo de secreción de MMP-9, pero la estimulación con VEs CM indujo un aumento en la secreción de MMP-9 y MMP-2 (Fig. 15B-D).

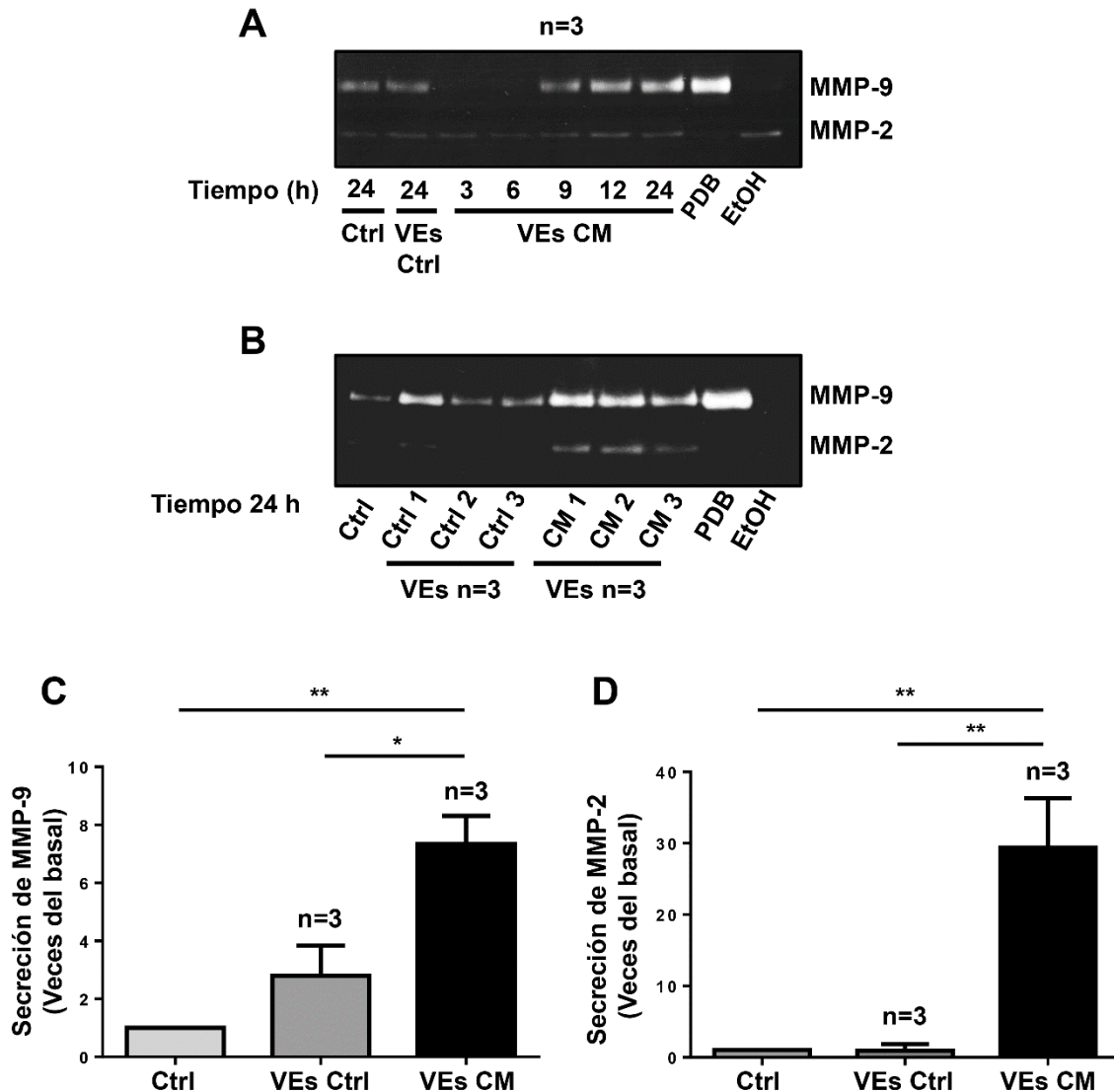


Figura 15. Las VEs de pacientes con cáncer de mama median la secreción de gelatinasas. (A) Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron estimulados con VEs de mujeres sanas y de mujeres con cáncer de mama a diferentes tiempos, posteriormente el medio condicionado fue colectado y concentrado por centrifugación. La secreción MMP-2 y MMP-9 se analizó en el medio condicionado usando geles que contenían gelatina como sustrato tal como se describe en la metodología experimental. **(B)** Células MDA-MB-231 se incubaron durante 24 h con VEs de tres mujeres sanas y VEs de tres pacientes con cáncer de mama. Como controles positivos se incluyeron medios condicionados de células MDA-MB-231 tratadas con etanol (EtOH) a una concentración de 1.6 mg/ml para MMP-2 y PDB a una concentración de 100ng/ml para MMP-9, durante 24 horas. **(C y D)** Análisis densitométrico de la secreción de MMP-2 y MMP-9. Los datos se presentan como la media \pm DE y se expresan como veces de incremento de la secreción de MMP-2 o MMP-9 respecto al Ctrl y VEs Ctrl. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra el Ctrl y VEs Ctrl. * P < 0.05, ** P < 0.01. n=número de muestras analizadas.

X. 2. 4. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la activación de Src.

Para determinar si el tratamiento de las células MDA-MB-231 con VEs CM induce la activación de Src, la cual está dada por fosforilación de su residuo en la tirosina 418 (Tyr-418-Src), las células MDA-MB-231 se trataron durante 20 minutos con tres muestras de VEs Ctrl y tres muestras de VEs CM. Posteriormente se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron mediante WB utilizando un anticuerpo anti-p-Src (anti-Src fosforilada). Los resultados indicaron que el tratamiento de células MDA-MB-231 con VEs Ctrl indujo un ligero incremento del nivel de fosforilación de Src en la Tyr-418, mientras que el tratamiento con VEs CM indujo un nivel alto de fosforilación de Src en Tyr-418 (Fig. 16A).

Estudios previos demostraron que las VEs derivadas de plasma de mujeres con cáncer de mama contienen niveles altos de Src y de su forma activa (p-Src). Por lo que, mediante WB, se determinó si las VEs Ctrl y VEs CM contienen p-Src y Src total. Los resultados mostraron que las VEs Ctrl contienen niveles bajos de p-Src, mientras que las VEs CM contienen niveles mayores de p-Src (Fig. 16B). Sin embargo, se demostró que tanto las VEs Ctrl y VEs CM contienen una cantidad similar de Src total (Fig. 16B).

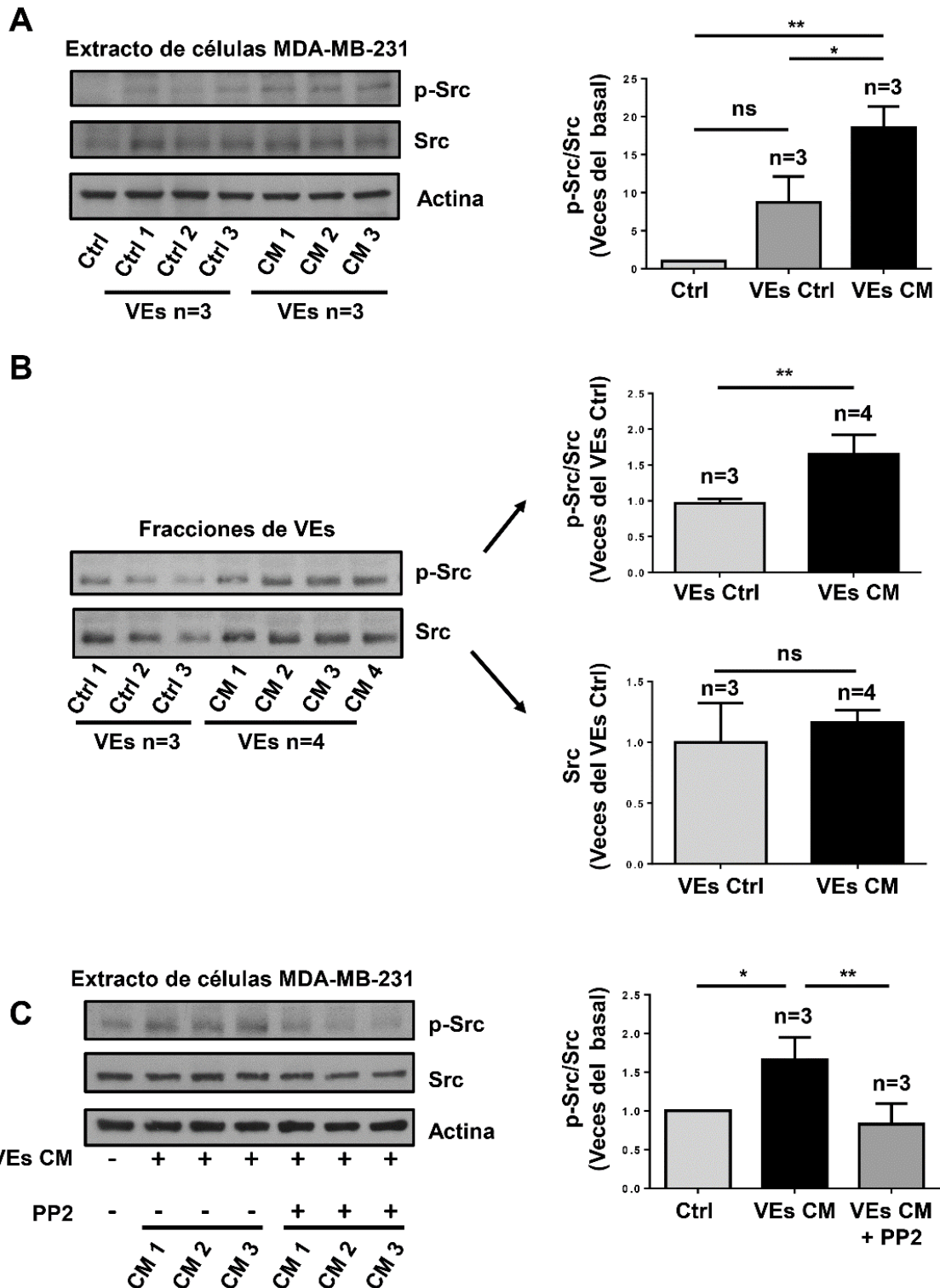


Figura 16. Las VEs aisladas de pacientes con cáncer de mama inducen la activación de Src. (A) Lisados de células MDA-MB-231 tratadas durante 20 minutos con tres VEs Ctrl y tres VEs CM se analizaron mediante WB con un anticuerpo anti-p-Src. Las membranas se analizaron

adicionalmente con un anticuerpo anti-Src como control de carga. **(B)** Tres VEs Ctrl y cuatro VEs CM se analizaron mediante WB con un anticuerpo anti-p-Src y anti-Src. **(C)**. Células MDA-MB-231 fueron pre-tratadas o no, durante 1 h con PP2 10 μ M y se estimularon durante 20 min con tres VEs CM. Los lisados celulares se analizaron mediante WB con un anticuerpo anti-p-Src. Las membranas se analizaron adicionalmente con anticuerpo anti-Src como control de carga. Las gráficas representan la media \pm DE, e indican las veces del incremento de p-Src o Src sobre el valor del Ctrl o Ctrl VEs. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra el Ctrl y Ctrl VEs. * P <0.05, ** P <0.01. ns, no significativo. n=número de muestras analizadas.

X. 2. 5. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la activación de FAK a través de la actividad Src.

Como se ha reportado, la activación de FAK puede ser dependiente e independiente de la actividad de la cinasa Src. El presente estudio determinó si las VEs CM inducen la activación de FAK, que es revelada por fosforilación en su residuo de Tyr-397 (p-FAK). Posterior al estímulo, se recuperaron los lisados de las células MDA-MB-231 tratadas durante 20 minutos con tres muestras VEs Ctrl y tres muestras VEs CM; y se analizaron mediante WB utilizando un anticuerpo anti-p-FAK. Los resultados revelaron que el tratamiento con VEs Ctrl indujo bajos niveles de fosforilación de FAK, mientras que el tratamiento con VEs CM indujo una fuerte fosforilación de FAK en Tyr-397 (Fig. 17A).

La activación de las cinasas Src y FAK ocurre como consecuencia de la activación río arriba de receptores membranales, incluyendo GPCRs, receptores de tirosina cinasa (RTKs) e integrinas; aunque la activación directa de FAK es dependiente de la actividad de Src. Para probar esto, se examinó el papel de Src utilizando PP2, el cual es un inhibidor específico de los miembros de la familia Src. Con este propósito, las células MDA-MB-231 fueron pre-tratadas con y sin 10 μ M de PP2 durante 1 hora, a continuación, se trataron durante 20 min con tres muestras independientes de VEs

CM, enseguida las células fueron lisadas con RIPA. Los lisados celulares se analizaron mediante WB utilizando un anticuerpo anti-p-Src. Los resultados revelaron que PP2 inhibió la activación Src inducida por VEs CM (Fig. 16C). Bajo la misma estrategia, se analizó la activación de FAK y se identificó que el tratamiento con VEs CM induce un aumento de p-FAK a través de una vía dependiente de Src en células MDA-MB-231 (Fig. 17B).

El presente estudio también evaluó si p-FAK y FAK estaban localizados en fracciones de VEs, así que tres muestras de VEs Ctrl y cuatro muestras de VEs CM se analizaron mediante WB utilizando anticuerpos contra p-FAK y FAK total. Los resultados mostraron que las VEs Ctrl y VEs CM expresaron niveles variables de p-FAK y FAK, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ellos (Fig. 17C).

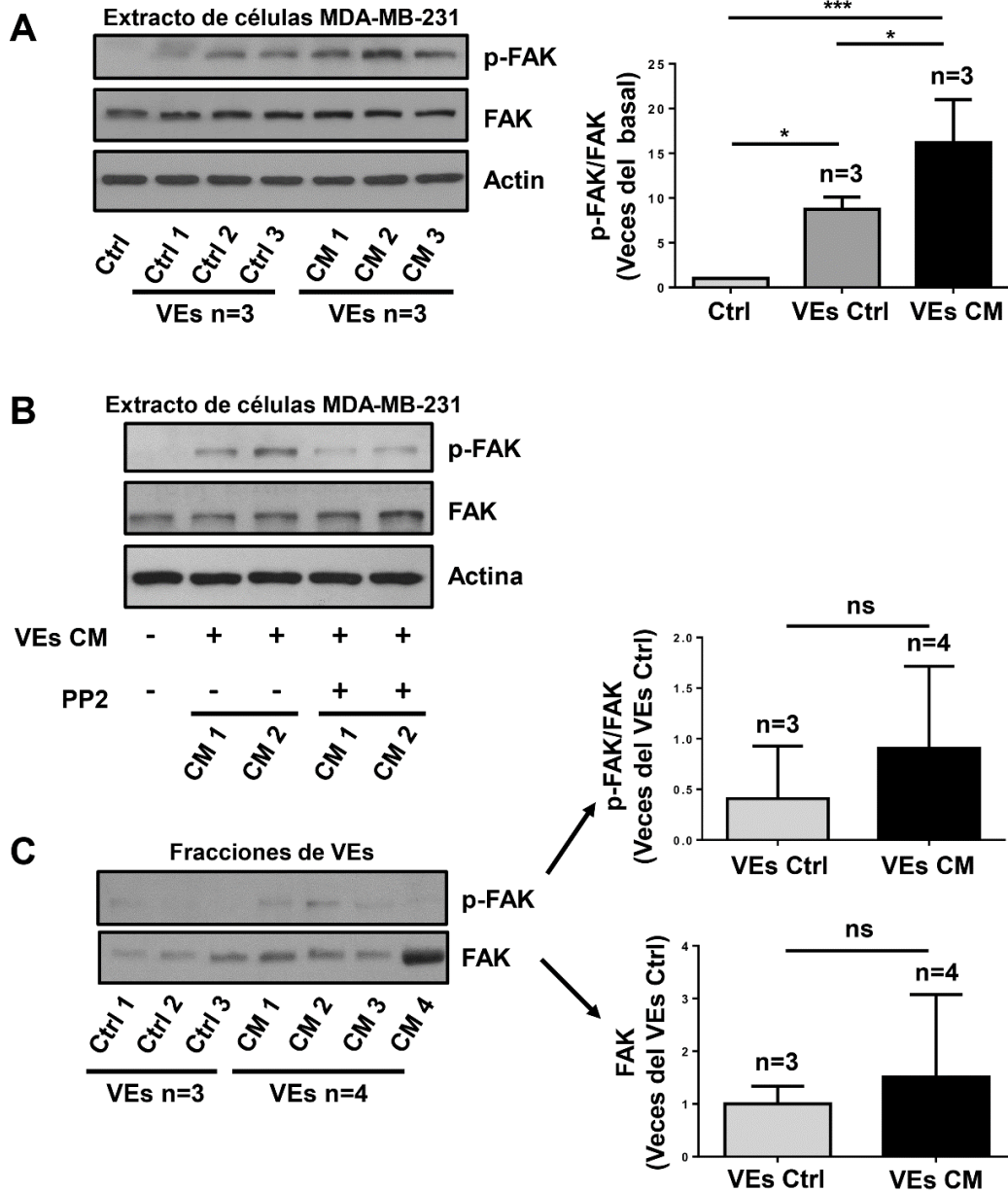


Figura 17. Las VEs aisladas de plasma de pacientes con cáncer de mama inducen la activación de FAK a través de una vía dependiente de Src. (A) Lisados de células MDA-MB-231 tratadas durante 20 minutos con tres VEs Ctrl y tres VEs CM se analizaron mediante WB con un anticuerpo anti-p-FAK. Las membranas se analizaron adicionalmente con un anticuerpo anti-FAK y anti-actina como controles de carga. (B) Las células MDA-MB-231 se trataron durante 1 h con 10 μ M de PP2 y se estimularon durante 20 min con dos VEs CM y finalizado el tiempo de estímulo se lisaron. Los lisados celulares se analizaron mediante WB con un anticuerpo anti-p-FAK. Las membranas se analizaron adicionalmente con un anticuerpo anti-FAK. (C) Se analizaron fracciones proteicas de tres VEs Ctrl y cuatro de VEs CM mediante WB con un anticuerpo anti-p-FAK y anti-FAK. Las gráficas representan la media \pm DE, e indican las veces de incremento de p-FAK o FAK con respecto al Ctrl y VEs Ctrl. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra el Ctrl y Ctrl VEs. * P <0.05, ** P <0.01. ns, no significativo. n=número de muestras analizadas.

X. 2. 6. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la redistribución de p-FAK y el ensamblaje de adhesiones focales.

La formación de contactos focales es un *hallmark* de las células tumorales, indicativo que tienen un alto potencial de migración. Existen distintos marcadores de contactos focales, entre ellos las proteínas vinculina, talina, paxilina y FAK. Por tal razón, se examinó si las VEs CM inducen una redistribución de p-FAK, así como el ensamblaje de adhesiones focales y el papel de Src en el ensamblaje de estos complejos. Para estudiar esto, las células MDA-MB-231 se cultivaron en cubreobjetos y fueron pre-tratadas o no durante 1 h con 10 μ M de PP2. Posteriormente, se estimularon con VEs Ctrl y VEs CM. La redistribución de p-FAK y el número de adhesiones focales se analizó por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-p-FAK y anti-vinculina, respectivamente. Los resultados revelaron que las VEs CM inducen la redistribución de p-FAK en los bordes delanteros de las células en migración y aumentan el número de adhesiones focales (Fig. 18A y B). Además, el ensamblaje de las adhesiones focales inducidas por las VEs CM fue dependiente de la actividad de la cinasa Src (Fig. 18B). Asimismo, se analizó la presencia de vinculina en las fracciones de VEs Ctrl y VEs CM mediante WB utilizando un anticuerpo anti-vinculina. Los resultados indicaron que las VEs Ctrl y VEs CM no transportan la proteína vinculina (Fig. 18C). Como control del anticuerpo anti-vinculina, se analizaron extractos totales de células MDA-MB-231 (Fig. 18D).

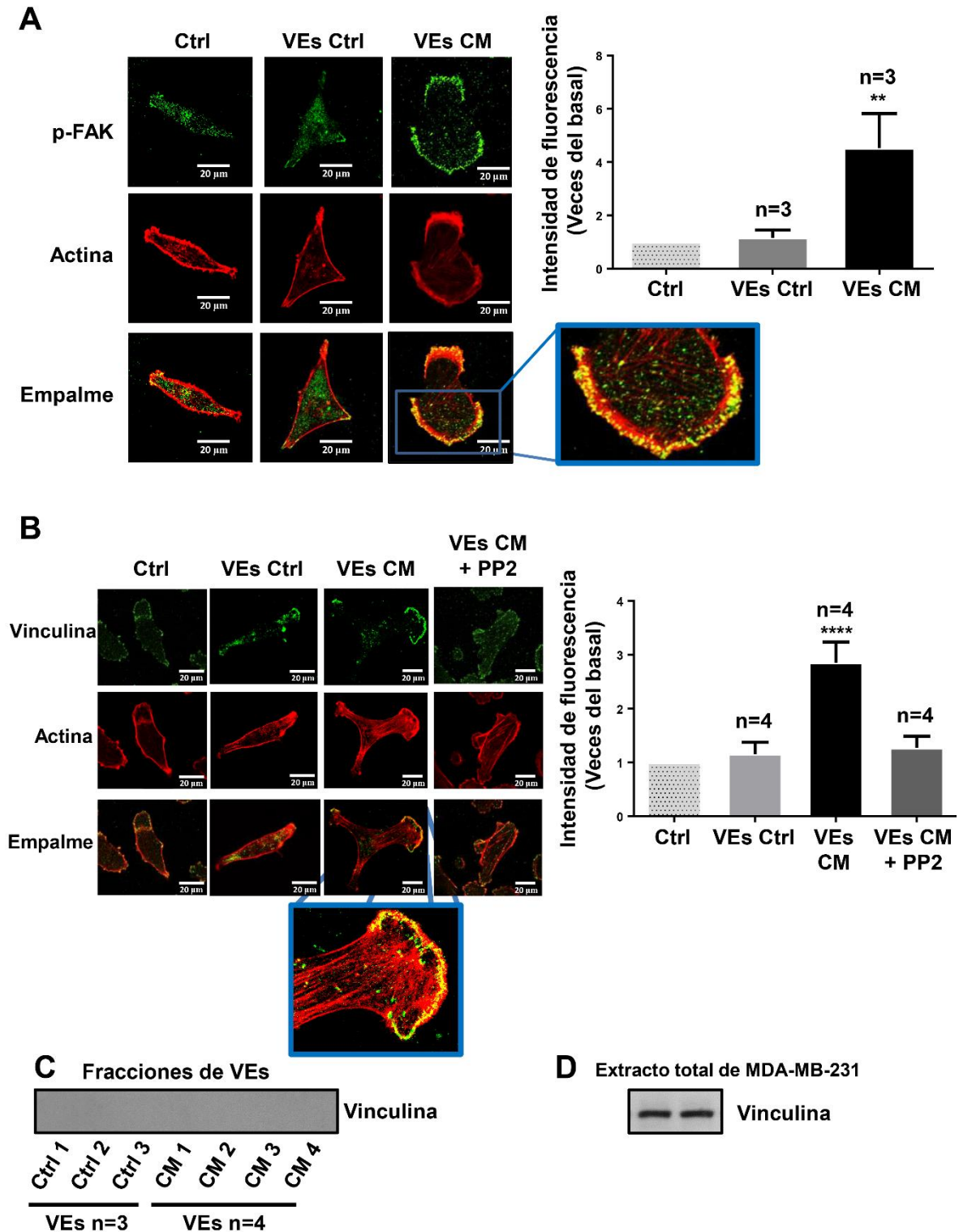


Figura 18. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen la redistribución de p-FAK y el ensamblaje de adhesiones focales. (A y B) Las células MDA-MB-231 cultivadas en cubreobjetos

fueron pre-tratadas durante 1 hora con o sin 10 μ M de PP2, y se estimularon durante 30 minutos con VEs Ctrl y VEs CM. A continuación, las células se incubaron con anticuerpos contra p-FAK y vinculina durante toda la noche. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario y faloidina conjugada con TRITC. Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal. **(C)** Análisis de vinculina en VEs Ctrl y VEs CM por WB. **(D)** Lisados de células MDA-MB-231 como control de la expresión de vinculina. Los gráficos representan la media \pm DE de las intensidades media de fluorescencia de p-FAK y vinculina, y se expresan como veces de incremento con respecto al Ctrl. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra el Ctrl. ** P <0.01, *** P <0.001. ns, no significativo. n=número de muestras analizadas.

X. 2. 7. Participación de Src en la migración e invasión inducida por VEs de pacientes con cáncer de mama.

Src es una proteína fundamental en el proceso migratorio de células sanas y cancerosas; su actividad comúnmente es exacerbada en células tumorales, esto como consecuencia de la activación aberrante de receptores membranales. Con la finalidad de evaluar el papel de Src en la migración de células MDA-MB-231, se utilizó PP2 y su análogo inactivo, PP3. Para este propósito, los cultivos de células MDA-MB-231 se trataron durante 1 h con 10 μ M de PP2, o con 10 μ M de PP3; posteriormente, se realizaron rayaduras sobre la monocapa celular y se estimularon con VEs Ctrl y VEs CM. Los resultados revelaron que la migración inducida por las VEs CM fue dependiente de la actividad de Src en las células MDA-MB-231 (Fig. 19A).

Por otro lado, también se estudió si las VEs CM inducen la invasión de células MDA-MB-231 y el papel de Src en estos eventos. Para ese fin, las células MDA-MB-231 fueron pre-tratadas con PP2, posteriormente estimuladas con VEs Ctrl y VEs CM. Los resultados indicaron que las VEs CM inducen invasión de las células MDA-MB-

231 (Fig. 19B). Además, los ensayos de invasión realizados en presencia de PP2 demostraron que la invasión es dependiente de la actividad de Src (Fig. 19C).

Finalmente, se examinó si las VEs CM inducen la proliferación de células MDA-MB-231. Para este propósito, utilizamos un kit comercial denominado WST-1. Los resultados del ensayo indicaron que las VEs Ctrl y VEs CM no inducen la proliferación de células MDA-MB-231 (Fig. 19D).

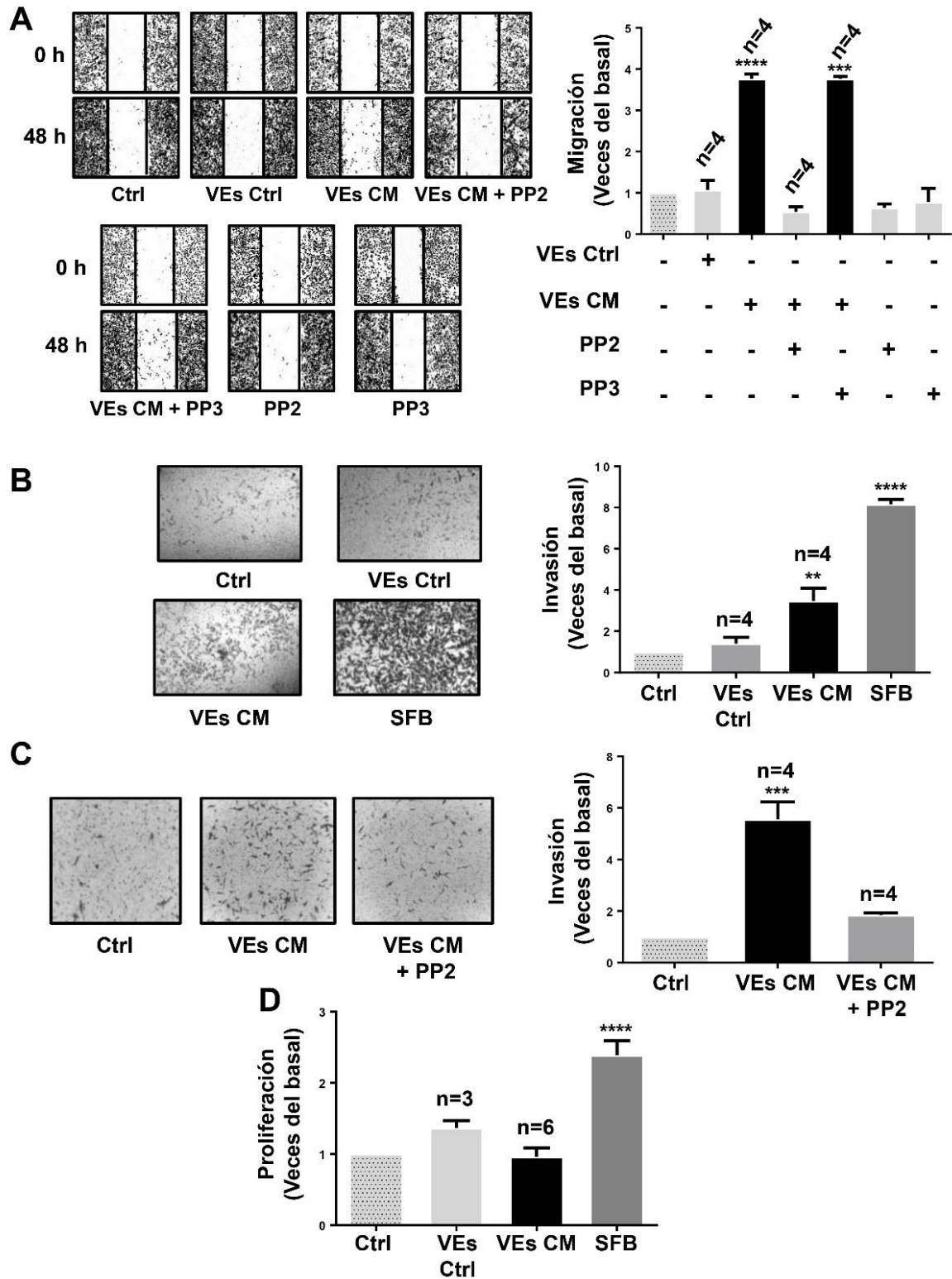


Figura 19. Las VEs de pacientes con cáncer de mama inducen migración e invasión a través de una vía dependiente de Src. (A) Ensayos de migración de células MDA-MB-231 pre-tratadas durante 1 h con o sin 10 μ M de PP2 o PP3, y estimuladas durante 48 h con VEs Ctrl y VEs CM. (B

y **C**) Ensayos de invasión de células MDA-MB-231 pre-tratadas con o sin PP2 10 μ M y estimuladas durante 72 h con VEs Ctrl y VEs CM. (**D**) Ensayo de proliferación de células MDA-MB-231 incubadas con VEs Ctrl y VEs CM. Las gráficas presentan la media \pm DE y se expresan como veces de incremento de migración, invasión o proliferación respecto al Ctrl. Los asteriscos indican resultados significativamente diferentes contra el Ctrl. ** P <0.01, *** P <0.001. Ctrl. n=número de muestras analizadas.

XI. DISCUSIÓN

XI. 1. Discusión de los resultados con VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL.

Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado una asociación entre dietas caracterizadas por una alta ingesta de ácidos grasos y el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Simopoulos, 2008). Concretamente, el AL es una fuente importante de energía y es el ácido graso más abundante en la dieta occidental (Calder, 2001). El AL, media una variedad de procesos celulares, incluyendo proliferación, migración e invasión a través de receptores acoplados a proteínas G (Reyes et al., 2004, Serna-Marquez et al., 2017, Serna-Marquez et al., 2013). Además, el AL induce la liberación de VEs que promueven la TEM en células mamarias no tumorales MCF10A (Galindo-Hernandez et al., 2014). En el presente trabajo, hipotetizamos que el tratamiento de células MDA-MB-231 con AL induce la liberación de VEs, las cuales median señalización vía autocrina/paracrina en células MDA-MB-231. Por lo tanto, este trabajo fue diseñado para estudiar si las VEs liberadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la migración e invasión, además evaluamos el papel de las cinasas Src y FAK en estos procesos.

Las VEs comprenden dos importantes clases de vesículas conocidas como exosomas y microvesículas, que son secretadas por muchos tipos celulares y tienen un rango de tamaño de 30-1000 nm (Raposo and Stoorvogel, 2013). En este estudio aislamos y caracterizamos VEs de células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con AL. Los resultados mostraron que las fracciones de VEs estaban compuestas de VEs con tamaño de 50 nm a los 500 nm y expresaron marcadores asociados a exosomas y microvesículas. Por lo tanto, la fracción de VEs que aislamos contiene exosomas y microvesículas. Los resultados obtenidos por NTA demostraron que tanto las fracciones de VEs Ctrl y VEs AL, están compuestas de una variedad de VEs de diferentes tamaños. Interesantemente las fracciones de VEs aisladas de células estimuladas con AL, mostraron una población mucho más heterogénea comparada con las VEs derivadas de células MDA-MB-231 que no recibieron tratamiento. Estos resultados sugieren que el AL induce la liberación y enriquecimiento de diferentes poblaciones de VEs en comparación con las células no tratadas.

El papel de los ácidos grasos en el contexto tumoral sigue siendo controversial, no obstante, los ácidos grasos ω -3 son asociados con una actividad anti-tumoral, y los ácidos grasos ω -6 son asociados con una actividad pro-tumoral. Concretamente, dos ácidos grasos ω -3, el ácido eicosapentanoico (EPA) y el docosahexanoico (DHA), así como las VEs de células de cáncer de mama tratadas con DHA inhiben la progresión de tumores mamarios y la formación de angiogénesis tumoral (Hannafon et al., 2015, Khadge et al., 2018). En contraste, dos ácidos grasos ω -6, el ácido araquidónico y el AL inducen migración e invasión en células de cáncer de

mama, además, VEs secretadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL promueven un proceso de TEM en células epiteliales no tumorales MCF10A (Byon et al., 2009, Galindo-Hernandez et al., 2014, Leal-Orta et al., 2019a, Serna-Marquez et al., 2017, Villegas-Comonfort et al., 2014). En el presente trabajo, demostramos que células MDA-MB-231 tratadas con AL liberan VEs que median una comunicación autocrina/paracrina para promover migración e invasión celular. Estos resultados sugieren fuertemente que el tratamiento de células MDA-MB-231 con AL induce la liberación de diferentes poblaciones de VEs con heterogeneidad en tamaño, cargo y función.

Estudios previos reportaron que el AL a través de la señalización mediada por receptores FFAR1 y/o FFAR4, inducen el incremento de concentración de Ca^{2+} intracelular, la activación de PLD y la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (Diaz-Aragon et al., 2019, Serna-Marquez et al., 2017, Yonezawa et al., 2004), las cuales podrían mediar la biogénesis, cambio de cargo y secreción de VEs en células MDA-MB-231 tratadas con AL. En línea con esta propuesta, en un reporte previo se encontró que la actividad de PLD es necesaria para la biogénesis de VEs (Laulagnier et al., 2004). En otro estudio se encontró que la insulina participa en el cambio de cargo a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt en células de cáncer color-rectal (Liem et al., 2017). Además, se demostró también que el aumento de Ca^{2+} intracelular incrementa la secreción de exosomas en células de leucemia humana K562 (Savina et al., 2003).

En cáncer, la degradación de la MEC es una etapa esencial durante la invasión y metástasis. Las VEs juegan un papel importante en los procesos de invasión y

metástasis debido a que las VEs transportan MMPs, tales como MMP-2, MMP-9, MT1-MMP y sus zimógenos (Dolo et al., 1998, Muralidharan-Chari et al., 2010). En este estudio encontramos que las VEs AL inducen un incremento en la secreción de MMP-9 y la invasión de células MDA-MB-231. Por lo tanto, proponemos que las células tumorales de mama tratadas con AL podrían liberar VEs que contienen moléculas involucradas en los procesos de invasión y/o metástasis, incluyendo MMPs. Apoyando nuestra propuesta, se reportó previamente que VEs de células tumorales transfieren biomoléculas activas a sus células diana, incluyendo ácidos nucleicos (microRNA, mRNA y ADN) y proteínas (factores de transcripción, receptores de factores de crecimiento y otras proteínas citosólicas y transmembranales) (Al-Nedawi et al., 2008, DeRita et al., 2017, Fedele et al., 2015, Kanada et al., 2016, Lee et al., 2014).

Las VEs representan un mecanismo adicional de comunicación celular que media procesos fisiológicos y patológicos. Además, las VEs son liberadas y capturadas por una variedad de células, incluyendo células de cáncer de mama (Raposo and Stoorvogel, 2013). Nuestros resultados mostraron que las células MDA-MB-231 capturan tanto las VEs Ctrl como las VEs AL. Sin embargo, únicamente las VEs AL potenciaron la migración y la invasión. Estos resultados demostraron también que la cinasa Src no participa en la captura de VEs, al menos no en esta línea celular. Por lo tanto, los resultados son consistentes con nuestra propuesta de que el AL induce cambios en la biogénesis, composición lipídica y carga en las VEs. No obstante, estos resultados también sugieren que la maquinaria de entrada o captura de VEs es un mecanismo conservado.

La migración celular es un evento esencial para la metástasis y este involucra la activación de una variedad de mecanismos celulares, incluyendo la reorganización del citoesqueleto de actina y el ensamble de adhesiones focales (Jiang et al., 2009). Estos procesos son regulados por la activación de numerosas rutas de señalización intracelulares, incluyendo la vía de PI3K/Akt (Xue and Hemmings, 2013); además de cinasas citosólicas, tales como Src y FAK, las cuales son integradoras de señales externas, tales como las inducidas por factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas (Bolos et al., 2010). Sin embargo, pocos estudios han descrito las vías de señalización inducidas por VEs y su papel en la migración e invasión celular. En este trabajo encontramos que las VEs AL inducen la activación de las proteínas Src, FAK y Akt2. Consecuentemente, la activación de FAK fue dependiente de la actividad cinasa de Src, sin embargo, la activación de Akt2 fue a través de un mecanismo independiente de Src. Estos resultados apoyan nuestra propuesta, de que las células MDA-MB-231 liberan poblaciones heterogéneas de VEs con una variedad de cargos que activan distintas rutas de señalización, los cuales median distintos procesos celulares.

XI. 2. Discusión de los resultados con VEs derivadas de plasma de pacientes con cáncer de mama.

Las VEs corresponden a un grupo de vesículas que incluye a exosomas y microvesículas, las cuales presentan un tamaño de 30 a 100 nm y de 100 a 1,000 nm, respectivamente (Raposo and Stoorvogel, 2013). En el presente trabajo aislamos VEs de muestras de plasma de mujeres sanas y de mujeres con cáncer; siguiendo la metodología previamente reportada por (Baran et al., 2010), ya que este grupo reportó que su método permite aislar VEs libres de VEs derivadas de plaquetas. Cabe mencionar que las VEs de plaquetas constituyen aproximadamente el 80% de la población total de VEs en plasma, por lo que se descartaron para que no interfirieran con nuestro estudio (Baran et al., 2010, Diamant et al., 2002). Nuestros resultados revelaron que las fracciones de VEs aisladas de plasma de mujeres sanas están constituidas por vesículas con tamaños entre 30-300 nm y las VEs derivadas de mujeres con cáncer, mostraron tamaños de 50-600 nm. Además, tanto las VEs Ctrl, así como las VEs CM expresaron marcadores moleculares asociados a VEs. Por lo tanto, deducimos que las fracciones de VEs aisladas de las muestras de plasma correspondieron a exosomas y microvesículas, las cuales no estuvieron contaminadas con restos celulares y cuerpos apoptóticos, y estuvieron libres de VEs derivados de plaquetas. Por lo tanto, postulamos que los procesos celulares estudiados en este trabajo podrían estar mediados por exosomas y/o microvesículas. Sin embargo, queda por investigar la contribución de manera independiente de las microvesículas y los exosomas en los procesos celulares aquí analizados.

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se reportó que el número de VEs estaba aumentado en pacientes con cáncer de mama en comparación con mujeres sanas (Galindo-Hernandez et al., 2013). En el presente trabajo se analizó una vez más el número de VEs, pero utilizando una estrategia distinta. Los resultados actuales demostraron que el número de VEs en plasma es mayor en mujeres con cáncer de mama que en mujeres sanas; sin embargo, el número de VEs que encontramos en este estudio es mayor que el número de VEs reportado previamente. Encontramos un número diferente de VEs porque en el presente estudio se determinó el número de VEs utilizando NTA, mientras que en el estudio anterior el número de VEs se determinó por citometría de flujo. Cabe resaltar que el NTA tiene una mayor sensibilidad para determinar el número de VEs en comparación con la citometría de flujo. No obstante, ambos estudios demostraron que el número de VEs es mayor en mujeres con cáncer de mama comparadas con mujeres sanas.

La metástasis del cáncer comprende pasos secuenciales que incluyen: desprendimiento de células, migración, invasión a los tejidos circundantes, intravasación, supervivencia en circulación, extravasación y colonización. Además, la invasión de células cancerosas a otros tejidos implica una migración celular individual (tipo mesenquimal) o una migración colectiva (Gupta and Massague, 2006). Las VEs están implicadas en la comunicación intercelular en el microambiente tumoral, ya que median una comunicación entre células cancerosas y células del estroma (Becker et al., 2016). En este contexto, las VEs contribuyen al desarrollo del cáncer mediante diferentes vías, como por ejemplo: la adaptación a

las condiciones de hipoxia, la privación de nutrientes, el escape de la apoptosis, la evasión inmune y la progresión del cáncer (Becker et al., 2016, Maas et al., 2017, Yanez-Mo et al., 2015). De manera particular, los exosomas liberados de fibroblastos asociados a cáncer (CAF) inducen la formación de protuberancias y motilidad en las células MDA-MB-231. Asimismo, otros estudios han reportado que las células troncales mesenquimales secretan exosomas que promueven la motilidad y la invasividad de células de cáncer de mama (Lin et al., 2013, Luga and Wrana, 2013). Del mismo modo, se ha demostrado que las células Hs578T y su variante más invasiva Hs578T (i) secretan VEs que promueven la proliferación, la migración y la invasión de células de cáncer de mama (O'Brien et al., 2013). En esta línea de ideas, los resultados de este trabajo mostraron que las VEs de mujeres con cáncer de mama en etapas II y III indujeron migración celular y esto dependió de la actividad de la cinasa Src en las células MDA-MB-231. En cambio, las VEs de mujeres sanas no indujeron la migración de células MDA-MB-231. Además, la migración inducida por las VEs de pacientes con cáncer de mama fue independiente de los niveles de expresión de los receptores de estrógeno, progesterona y Her-2/neu de los tumores de los pacientes de donde se obtuvieron estas VEs. En contraste, se identificó que las VEs CM no indujeron la migración en las células MCF-7 y no indujeron migración e invasión en las células epiteliales mamarias MCF-12A. Sin embargo, en contraste con nuestros resultados, se describió que concentraciones fisiológicas de exosomas de mujeres sanas estimulan la migración y la invasión en las células MDA-MB-231 (Shtam et al., 2019). Por lo tanto, postulamos que las fracciones de VEs derivadas de mujeres con cáncer están constituidas por subpoblaciones de exosomas y microvesículas secretadas tanto

por células cancerosas mamarias y células del estroma transformado, como los macrófagos asociados a tumor, las células troncales mesenquimales y los fibroblastos asociados a tumor. Por tal razón, las VEs CM mostraron una mayor capacidad para inducir migración e invasión de células MDA-MB-231 en comparación con las VEs Ctrl. Asimismo, las condiciones experimentales y el número de VEs con que se estimularon las células MDA-MB-231 fueron distintas, entre el estudio mencionado y el nuestro. Mientras nosotros estimulamos con un número de VEs significativamente bajo (~20,000 VEs), en el trabajo mencionado estimularon con un número elevado de VEs (2×10^{10} VEs); así pues, bajo nuestras condiciones, cuando comparamos la capacidad promotora de migración e invasión de las VEs Ctrl y las VEs CM, las VEs CM son capaces de potenciar esos procesos.

En línea a lo anterior, proponemos que las VEs CM contienen un enriquecimiento de moléculas que inducen la activación de rutas de transducción de señales específicas, incluida la activación de Src, que media una variedad de procesos celulares, incluida la migración e invasión de células de cáncer de mama. Sin embargo, notamos que las VEs CM no fueron capaces de promover migración y/o invasión en las células epiteliales mamarias MCF-12A y MCF-7, las cuales expresan receptores de progesterona y estrógenos. Esto sugiere que puede ser un mecanismo propio de las células triples negativo de cáncer de mama, o que se necesitan concentraciones más elevadas para poder promover este proceso en las células no tumorales MCF-12A y células tumorales MCF-7. Dicho de otro modo, las células tumorales triple negativas parecen ser más sensibles a estímulos con VEs comparadas con las células no tumorales y células tumorales con baja capacidad

migratoria. En línea con estos resultados, se reportó que el tratamiento de células epiteliales mamarias humanas HMLE con exosomas de células MDA-MB-231 transfectadas con miR-1246, aumenta su capacidad de resistencia a los medicamentos y la capacidad de crecimiento e invasión celular (Li et al., 2017). Del mismo modo, las células de leucemia mieloide K562, liberan exosomas que promueven la angiogénesis a través de la activación de Src, mientras que los exosomas de las células de cáncer de próstata C4-2B, PC3 y DUI45 transportan como carga la cinasa Src, el receptor de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) y FAK, que son moléculas involucradas en la migración y en la invasión celular (DeRita et al., 2017, Mineo et al., 2012).

Las células tumorales se comunican con las células circundantes, incluidos los CAFs, las células endoteliales y las células mesenquimales, a través de la secreción y la captación de VEs, que median procesos biológicos, como la migración, la angiogénesis, la invasión; también pueden modular el microambiente tumoral y la metástasis (Becker et al., 2016, Naito et al., 2017, They et al., 2002). Nuestros resultados mostraron que las células MDA-MB-231 pueden capturar tanto las VEs Ctrl y VEs CM, sin embargo, solo las VEs CM inducen migración e invasión celular. Por lo tanto, proponemos que las VEs CM expresan moléculas que promueven la activación de vías de transducción de señales específicas que aumentan la migración y la invasión en las células de cáncer de mama.

Las VEs expresan PS en su membrana y se presume que media la fusión de las VEs con sus células blanco. En este sentido, el tratamiento de VEs con Anx V inhibe la fusión de VEs con células diana, ya que la Anx V tiene una alta afinidad por PS e

impide la fusión de las VEs con sus células blanco (Becker et al., 2016, Meckes et al., 2010, Keller et al., 2009). En este estudio, se identificó que el tratamiento de las VEs Ctrl con Anx V inhibió el aumento de la intensidad media de fluorescencia de células MDA-MB-231 tratadas con VEs Ctrl teñidas. Sin embargo, el tratamiento de VEs CM con Anx V no inhibió el aumento de la intensidad media de fluorescencia de células MDA-MB-231 tratadas con VEs CM teñidas. Por lo tanto, postulamos que las VEs CM no expresan, o expresan niveles muy bajos, de PS en su membrana. Apoyando nuestra propuesta, se ha demostrado que las fracciones de VEs obtenidas de mujeres con diabetes tipo I y de grupos controles sin enfermedad, contienen tanto VEs que expresan PS y VEs sin expresión de PS, lo que es consistente con nuestros resultados. Además, en el estudio mencionado, el porcentaje de PS en VEs de pacientes con diabetes de tipo I fue del 31%, mientras que el porcentaje de PS en el grupo control sin enfermedad fue del 44% (Bergen et al., 2018).

Las cinasas de la familia de Src median una variedad de procesos celulares, como la progresión del ciclo celular, la proliferación, la sobrevivencia y la migración (Kim et al., 2009). Se ha reportado que los tumores y las líneas celulares de cáncer de mama tienen un aumento en la actividad de Src (Egan et al., 1999). Interesantemente, distintos estímulos, incluyendo ácidos grasos inducen la activación de Src y FAK (Serna-Marquez et al., 2013). Los resultados del presente trabajo, demostraron que la estimulación con VEs CM indujo una fuerte activación de Src y FAK, en comparación con el tratamiento con VEs Ctrl; asimismo, las VEs CM indujeron un aumento del número de adhesiones focales en células MDA-MB-

231. Debido a que la activación de Src y FAK y el ensamblaje de adhesiones focales median la migración y la invasión, se especuló que las VEs CM inducen la activación de vías de transducción de señales, incluidas la activación de FAK y Src, que median la migración y la invasión en las células MDA-MB-231. En línea con nuestros resultados, los fibroblastos de embriones de ratón que expresan la proteína onco-Dbl liberan microvesículas que contienen FAK. La estimulación de fibroblastos con estas vesículas promueve la proliferación y la sobrevivencia independiente de anclaje (Kreger et al., 2016).

Se han identificado una variedad de fosfoproteínas dentro de las VEs derivadas de plasma humano, incluida la cinasa Src (Chen et al., 2017). Además, en un estudio previo reportamos que las VEs de plasma de mujeres con cáncer de mama contienen las proteínas FAK y EGFR, y el nivel de estas cinasas aumenta en etapas específicas del cáncer de mama, en comparación con el grupo control (Galindo-Hernandez et al., 2013). En este trabajo, los resultados revelaron que tanto las VEs Ctrl y las VEs CM contienen niveles similares de expresión de p-FAK, FAK y Src, pero las VEs CM contienen niveles mayores de p-Src en comparación con las VEs Ctrl. Asimismo, nosotros encontramos que las VEs CM indujeron una mayor activación de FAK y Src; sin embargo, la contribución de p-FAK, FAK, p-Src y Src expresada en las VEs en la activación de estas cinasas en las células MDA-MB-231 requiere estudios adicionales.

Un modelo catalítico de activación recíproca de FAK y Src se ha reportado previamente, donde Src se asocia con FAK y la fosforila en sus residuos Tyr-576 y Tyr-577, lo que induce la actividad máxima de cinasa de FAK. Además, se ha

revelado que la actividad de cinasa de FAK promueve la fosforilación intermolecular entre las moléculas de FAK en Tyr-397, lo que induce una amplificación de señales (Bolos et al., 2010, Salazar and Rozengurt, 2001). En línea con este modelo, nuestros resultados demostraron que las VEs CM indujeron la activación de FAK, que dependió de la actividad de la cinasa Src. Notablemente, varios estudios de nuestro laboratorio han reportado que ácidos grasos, incluyendo el AL, el ácido oleico y el ácido araquidónico inducen la activación de FAK a través de GPCR e inducen un mecanismo de activación catalítico recíproco de FAK (Navarro-Tito et al., 2008, Navarro-Tito et al., 2010, Serna-Marquez et al., 2013, Soto-Guzman et al., 2008). Por lo tanto, proponemos que las VEs CM median la activación de Src y FAK, así como la migración e invasión a través de la activación de receptores membranales. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para corroborar esta propuesta y, además, no descartamos la participación de proteínas citosólicas y de moléculas de naturaleza no proteicas en estos procesos.

Los tumores liberan VEs que juegan un papel fundamental en los procesos de invasión y metástasis, en este sentido se ha reportado que las VEs de pacientes con cáncer de mama están asociados con metástasis y recaídas (Au Yeung et al., 2016, Becker et al., 2016). En este estudio, se identificó que las VEs de pacientes con cáncer de mama indujeron migración e invasión a través de la actividad Src en células MDA-MB-231. Además, en línea con nuestros resultados, se ha reportado que los exosomas de pacientes con cáncer de mama triple negativos inducen invasión de células SKBR3 (O'Brien et al., 2013). En contraste, encontramos que el tratamiento de las células epiteliales mamarias no tumorigénicas MCF-12A con VEs

CM no inducen migración e invasión. Proponemos que las VEs CM pueden mediar la progresión de cáncer de mama mediante la transferencia de moléculas y la activación de la vía de transducción de señales relacionadas a los procesos celulares aquí estudiados. Apoyando nuestra propuesta, diferentes tumores liberan VEs con una variedad de patrones de expresión de integrinas, que pueden determinar metástasis a órganos específicos. Específicamente, las VEs que expresan integrinas $\alpha6\beta4$ y $\alpha6\beta1$ están asociadas con metástasis pulmonares, mientras que las VEs que expresan $\alpha v\beta5$ están asociados con metástasis hepáticas (Hoshino et al., 2015).

Se requiere degradación de la MEC para el crecimiento tumoral y la metástasis (Hotary et al., 2006). Se reportó previamente que las VEs contienen proteasas que median la degradación de la MEC. En esta línea de ideas, se encontró que las células de fibrosarcoma humano HT1080 liberan VEs que expresan gelatinasas en forma activa, mientras que las células de cáncer de mama 8701-BC secretan VEs que contienen MMP-9 (Dolo et al., 1998, Ginestra et al., 1997). Nuestros resultados mostraron que las VEs CM indujeron un aumento en la secreción de MMP-9 y MMP-2 en células MDA-MB-231. Por lo tanto, estos resultados soportan la idea de que las VEs pueden participar durante la progresión del cáncer de mama.

XII. CONCLUSIONES

Parte 1

En conclusión, este trabajo establece que el AL promueve la liberación de VEs que incrementan la migración e invasión a través de un mecanismo dependiente de Src en células MDA-MB-231. Además, las VEs AL inducen un incremento de la secreción de MMP-9 y la activación de las proteínas FAK y Akt2. Conjuntamente, estos resultados integran información de cómo el AL a través de la liberación de VEs confiere a las células tumorales de mama MDA-MB-231 propiedades más agresivas. Finalmente, estos resultados podrían servir para el diseño de nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer de mama y de dietas para la prevención de la progresión del cáncer de mama (Fig. 20).

Parte 2

En conclusión, se demostró que las VEs CM promueven la migración, la invasión y la secreción de MMP-2 y MMP-9 en células MDA-MB-231. Además, las VEs CM incrementan la migración y la invasión de células MDA-MB-231 a través de una vía dependiente del complejo Src/FAK. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las VEs participan y promueven la progresión del cáncer de mama (Fig. 20).

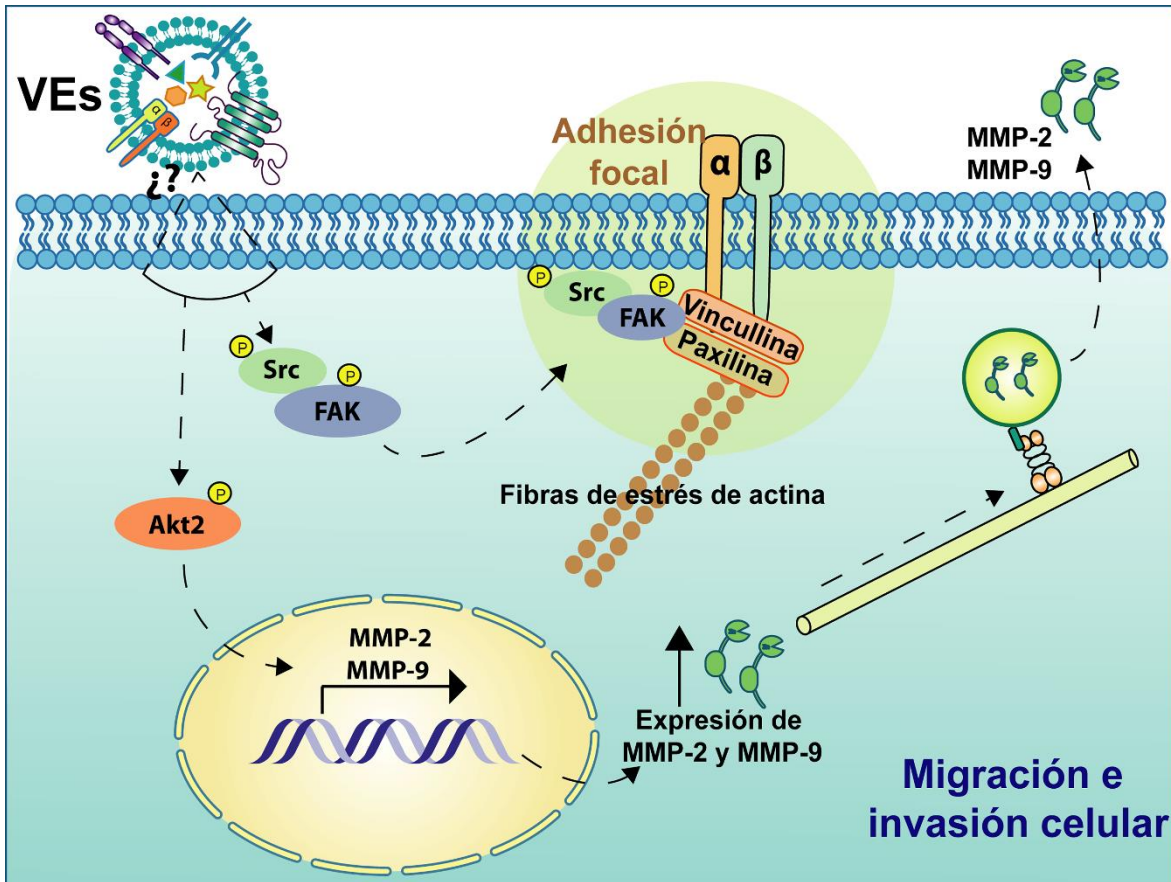


Figura 20. Funciones propuestas de VEs secretadas por células MDA-MB-231 tratadas con AL y VEs derivadas de plasma de pacientes con cáncer de mama en la migración e invasión de las células MDA-MB-231.

XIII. PERSPECTIVAS

1. Estudiar el contenido de las VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL mediante proteómica y por microarreglos.
2. Estudiar el mecanismo por el cual el AL induce el cambio de carga y liberación VEs en células MDA-MB-231.
3. Estudiar como el mecanismo de señalización por el cual las VEs activan a las cinasas Src y FAK.
4. Estudiar el contenido de las VEs de pacientes mediante proteómica y microarreglos.

XIV. REFERENCIAS

- ABAK, A., ABHARI, A. & RAHIMZADEH, S. 2018. Exosomes in cancer: small vesicular transporters for cancer progression and metastasis, biomarkers in cancer therapeutics. *PeerJ*, 6, e4763.
- AL-NEDAWI, K., MEEHAN, B., KERBEL, R. S., ALLISON, A. C. & RAK, J. 2009. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 3794-9.
- AL-NEDAWI, K., MEEHAN, B., MICALLEF, J., LHOTAK, V., MAY, L., GUHA, A. & RAK, J. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10, 619-24.
- ANDREOLA, G., RIVOLTINI, L., CASTELLI, C., HUBER, V., PEREGO, P., DEHO, P., SQUARCINA, P., ACCORNERO, P., LOZUPONE, F., LUGINI, L., STRINGARO, A., MOLINARI, A., ARANCIA, G., GENTILE, M., PARMIANI, G. & FAIS, S. 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*, 195, 1303-16.
- ANTONYAK, M. A., LI, B., BOROUGHS, L. K., JOHNSON, J. L., DRUSO, J. E., BRYANT, K. L., HOLOWKA, D. A. & CERIONE, R. A. 2011. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 4852-7.
- AU YEUNG, C. L., CO, N. N., TSURUGA, T., YEUNG, T. L., KWAN, S. Y., LEUNG, C. S., LI, Y., LU, E. S., KWAN, K., WONG, K. K., SCHMANDT, R., LU, K. H. & MOK, S. C. 2016. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun*, 7, 11150.
- AZRAD, M., TURGEON, C. & DEMARK-WAHNEFRIED, W. 2013. Current evidence linking polyunsaturated Fatty acids with cancer risk and progression. *Front Oncol*, 3, 224.

- BARAN, J., BAJ-KRZYWORZEKA, M., WEGLARCZYK, K., SZATANEK, R., ZEMBALA, M., BARBASZ, J., CZUPRYNA, A., SZCZEPANIK, A. & ZEMBALA, M. 2010. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 59, 841-50.
- BECKER, A., THAKUR, B. K., WEISS, J. M., KIM, H. S., PEINADO, H. & LYDEN, D. 2016. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 30, 836-848.
- BELLIS, S. L., MILLER, J. T. & TURNER, C. E. 1995. Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, 270, 17437-41.
- BENATTI, P., PELUSO, G., NICOLAI, R. & CALVANI, M. 2004. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr*, 23, 281-302.
- BERGEN, K., MOBARREZ, F., JORNESKOG, G., WALLEN, H. & TEHRANI, S. 2018. Phosphatidylserine expressing microvesicles in relation to microvascular complications in type 1 diabetes. *Thromb Res*, 172, 158-164.
- BIANCHINI, G., BALKO, J. M., MAYER, I. A., SANDERS, M. E. & GIANNI, L. 2016. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*, 13, 674-690.
- BOLOS, V., GASENT, J. M., LOPEZ-TARRUELLA, S. & GRANDE, E. 2010. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Onco Targets Ther*, 3, 83-97.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- BRISKEN, C. & O'MALLEY, B. 2010. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003178.
- BRZozowski, J. S., JANKOWSKI, H., BOND, D. R., MCCAGUE, S. B., MUNRO, B. R., PREDEBON, M. J., SCARLETT, C. J., SKELDING, K. A. &

- WEIDENHOFER, J. 2018. Lipidomic profiling of extracellular vesicles derived from prostate and prostate cancer cell lines. *Lipids Health Dis*, 17, 211.
- BYON, C. H., HARDY, R. W., REN, C., PONNAZHAGAN, S., WELCH, D. R., MCDONALD, J. M. & CHEN, Y. 2009. Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4. *Lab Invest*, 89, 1221-8.
- CALALB, M. B., POLTE, T. R. & HANKS, S. K. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, 15, 954-63.
- CALDER, P. C. 2001. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*, 36, 1007-24.
- CHAJES, V., TORRES-MEJIA, G., BIESSY, C., ORTEGA-OLVERA, C., ANGELES-LLERENAS, A., FERRARI, P., LAZCANO-PONCE, E. & ROMIEU, I. 2012. omega-3 and omega-6 Polyunsaturated fatty acid intakes and the risk of breast cancer in Mexican women: impact of obesity status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21, 319-26.
- CHAVARRI-GUERRA, Y., VILLARREAL-GARZA, C., LIEDKE, P. E., KNAUL, F., MOHAR, A., FINKELSTEIN, D. M. & GOSS, P. E. 2012. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol*, 13, e335-43.
- CHEN, I. H., XUE, L., HSU, C. C., PAEZ, J. S., PAN, L., ANDALUZ, H., WENDT, M. K., ILIUK, A. B., ZHU, J. K. & TAO, W. A. 2017. Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 3175-3180.
- CHO, J. A., PARK, H., LIM, E. H. & LEE, K. W. 2012. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol*, 40, 130-8.
- COSTA-SILVA, B., AIELLO, N. M., OCEAN, A. J., SINGH, S., ZHANG, H., THAKUR, B. K., BECKER, A., HOSHINO, A., MARK, M. T., MOLINA, H., XIANG, J., ZHANG, T., THEILEN, T. M., GARCIA-SANTOS, G., WILLIAMS, C., ARARSO, Y., HUANG, Y., RODRIGUES, G., SHEN, T. L., LABORI, K. J.,

- LOTHE, I. M., KURE, E. H., HERNANDEZ, J., DOUSSOT, A., EBBESEN, S. H., GRANDGENETT, P. M., HOLLINGSWORTH, M. A., JAIN, M., MALLYA, K., BATRA, S. K., JARNAGIN, W. R., SCHWARTZ, R. E., MATEI, I., PEINADO, H., STANGER, B. Z., BROMBERG, J. & LYDEN, D. 2015. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*, 17, 816-26.
- COUSSENS, L. M., FINGLETON, B. & MATRISIAN, L. M. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 295, 2387-92.
- DERITA, R. M., ZERLANKO, B., SINGH, A., LU, H., IOZZO, R. V., BENOVIC, J. L. & LANGUINO, L. R. 2017. c-Src, Insulin-Like Growth Factor I Receptor, G-Protein-Coupled Receptor Kinases and Focal Adhesion Kinase are Enriched Into Prostate Cancer Cell Exosomes. *J Cell Biochem*, 118, 66-73.
- DIAMANT, M., NIEUWLAND, R., PABLO, R. F., STURK, A., SMIT, J. W. & RADDER, J. K. 2002. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 106, 2442-7.
- DIAZ-ARAGON, R., RAMIREZ-RICARDO, J., CORTES-REYNOSA, P., SIMONI-NIEVES, A., GOMEZ-QUIROZ, L. E. & PEREZ SALAZAR, E. 2019. Role of phospholipase D in migration and invasion induced by linoleic acid in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 457, 119-132.
- DIETERICH, M., STUBERT, J., REIMER, T., ERICKSON, N. & BERLING, A. 2014. Influence of lifestyle factors on breast cancer risk. *Breast Care (Basel)*, 9, 407-14.
- DOLO, V., GINESTRA, A., CASSARA, D., VIOLINI, S., LUCANIA, G., TORRISI, M. R., NAGASE, H., CANEVARI, S., PAVAN, A. & VITTORELLI, M. L. 1998. Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 58, 4468-74.
- EGAN, C., PANG, A., DURDA, D., CHENG, H. C., WANG, J. H. & FUJITA, D. J. 1999. Activation of Src in human breast tumor cell lines: elevated levels of

- phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530. *Oncogene*, 18, 1227-37.
- EGBLAD, M. & WERB, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 161-74.
- 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.
- FEDELE, C., SINGH, A., ZERLANKO, B. J., IOZZO, R. V. & LANGUINO, L. R. 2015. The alphavbeta6 integrin is transferred intercellularly via exosomes. *J Biol Chem*, 290, 4545-51.
- FUENTES, P., SESE, M., GUIJARRO, P. J., EMPERADOR, M., SANCHEZ-REDONDO, S., PEINADO, H., HUMMER, S. & RAMON, Y. C. S. 2020. ITGB3-mediated uptake of small extracellular vesicles facilitates intercellular communication in breast cancer cells. *Nat Commun*, 11, 4261.
- GALINDO-HERNANDEZ, O., GONZALES-VAZQUEZ, C., CORTES-REYNOSA, P., REYES-URIBE, E., CHAVEZ-OCANA, S., REYES-HERNANDEZ, O., SIERRA-MARTINEZ, M. & SALAZAR, E. P. 2015. Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol*, 36, 9649-59.
- GALINDO-HERNANDEZ, O., SERNA-MARQUEZ, N., CASTILLO-SANCHEZ, R. & SALAZAR, E. P. 2014. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 91, 299-310.
- GALINDO-HERNANDEZ, O., VILLEGAS-COMONFORT, S., CANDANEDO, F., GONZALEZ-VAZQUEZ, M. C., CHAVEZ-OCANA, S., JIMENEZ-VILLANUEVA, X., SIERRA-MARTINEZ, M. & SALAZAR, E. P. 2013. Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients. *Arch Med Res*, 44, 208-14.
- GARRIDO-CASTRO, A. C., LIN, N. U. & POLYAK, K. 2019. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov*, 9, 176-198.

- GEORGIADI, A. & KERSTEN, S. 2012. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv Nutr*, 3, 127-34.
- GINESTRA, A., MONEA, S., SEGHEZZI, G., DOLO, V., NAGASE, H., MIGNATTI, P. & VITTORELLI, M. L. 1997. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem*, 272, 17216-22.
- GUPTA, G. P. & MASSAGUE, J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127, 679-95.
- GYORGY, B., SZABO, T. G., PASZTOI, M., PAL, Z., MISJAK, P., ARADI, B., LASZLO, V., PALLINGER, E., PAP, E., KITTEL, A., NAGY, G., FALUS, A. & BUZAS, E. I. 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2667-88.
- HANKE, J. H., GARDNER, J. P., DOW, R. L., CHANGELIAN, P. S., BRISSETTE, W. H., WERINGER, E. J., POLLOK, B. A. & CONNELLY, P. A. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*, 271, 695-701.
- HANNAFON, B. N., CARPENTER, K. J., BERRY, W. L., JANKNECHT, R., DOOLEY, W. C. & DING, W. Q. 2015. Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Mol Cancer*, 14, 133.
- HARA, T., KIMURA, I., INOUE, D., ICHIMURA, A. & HIRASAWA, A. 2013. Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 164, 77-116.
- HARBECK, N., PENAULT-LLORCA, F., CORTES, J., GNANT, M., HOUSSAMI, N., POORTMANS, P., RUDDY, K., TSANG, J. & CARDOSO, F. 2019. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 5, 66.
- HASSIOTOU, F. & GEDDES, D. 2013. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat*, 26, 29-48.

- HILLERS-ZIEMER, L. E. & ARENDT, L. M. 2020. Weighing the Risk: effects of Obesity on the Mammary Gland and Breast Cancer Risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 25, 115-131.
- 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.
- HONG, B. S., CHO, J. H., KIM, H., CHOI, E. J., RHO, S., KIM, J., KIM, J. H., CHOI, D. S., KIM, Y. K., HWANG, D. & GHO, Y. S. 2009. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*, 10, 556.
- HOSHINO, A., COSTA-SILVA, B., SHEN, T. L., RODRIGUES, G., HASHIMOTO, A., TESIC MARK, M., MOLINA, H., KOHSAKA, S., DI GIANNATALE, A., CEDER, S., SINGH, S., WILLIAMS, C., SOPLOP, N., URYU, K., PHARMER, L., KING, T., BOJMAR, L., DAVIES, A. E., ARARSO, Y., ZHANG, T., ZHANG, H., HERNANDEZ, J., WEISS, J. M., DUMONT-COLE, V. D., KRAMER, K., WEXLER, L. H., NARENDRAN, A., SCHWARTZ, G. K., HEALEY, J. H., SANDSTROM, P., LABORI, K. J., KURE, E. H., GRANDGENETT, P. M., HOLLINGSWORTH, M. A., DE SOUSA, M., KAUR, S., JAIN, M., MALLYA, K., BATRA, S. K., JARNAGIN, W. R., BRADY, M. S., FODSTAD, O., MULLER, V., PANTEL, K., MINN, A. J., BISSELL, M. J., GARCIA, B. A., KANG, Y., RAJASEKHAR, V. K., GHAJAR, C. M., MATEI, I., PEINADO, H., BROMBERG, J. & LYDEN, D. 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527, 329-35.
- HOTARY, K., LI, X. Y., ALLEN, E., STEVENS, S. L. & WEISS, S. J. 2006. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev*, 20, 2673-86.
- HOUTHUIJZEN, J. M. 2016. For Better or Worse: FFAR1 and FFAR4 Signaling in Cancer and Diabetes. *Mol Pharmacol*, 90, 738-743.
- HUBER, V., FAIS, S., IERO, M., LUGINI, L., CANESE, P., SQUARCINA, P., ZACCHEDDU, A., COLONE, M., ARANCIA, G., GENTILE, M., SEREGNI, E.,

- VALENTI, R., BALLABIO, G., BELLI, F., LEO, E., PARMIANI, G. & RIVOLTINI, L. 2005. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*, 128, 1796-804.
- JIANG, P., ENOMOTO, A. & TAKAHASHI, M. 2009. Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer Lett*, 284, 122-30.
- KAHLERT, C., MELO, S. A., PROTOPOPOV, A., TANG, J., SETH, S., KOCH, M., ZHANG, J., WEITZ, J., CHIN, L., FUTREAL, A. & KALLURI, R. 2014. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*, 289, 3869-75.
- KANADA, M., BACHMANN, M. H. & CONTAG, C. H. 2016. Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. *Trends Cancer*, 2, 84-94.
- KAWAMOTO, T., OHGA, N., AKIYAMA, K., HIRATA, N., KITAHARA, S., MAISHI, N., OSAWA, T., YAMAMOTO, K., KONDOH, M., SHINDOH, M., HIDA, Y. & HIDA, K. 2012. Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis. *PLoS One*, 7, e34045.
- KE, Z., LIN, H., FAN, Z., CAI, T. Q., KAPLAN, R. A., MA, C., BOWER, K. A., SHI, X. & LUO, J. 2006. MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. *Int J Cancer*, 119, 8-16.
- KELLER, S., KONIG, A. K., MARME, F., RUNZ, S., WOLTERINK, S., KOENSGEN, D., MUSTEA, A., SEHOULI, J. & ALTEVOGT, P. 2009. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett*, 278, 73-81.
- KHADGE, S., THIELE, G. M., SHARP, J. G., MCGUIRE, T. R., KLASSEN, L. W., BLACK, P. N., DIRUSSO, C. C., COOK, L. & TALMADGE, J. E. 2018. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease mammary tumor growth, multiorgan metastasis and enhance survival. *Clin Exp Metastasis*, 35, 797-818.

- KIM, J. W., WIECKOWSKI, E., TAYLOR, D. D., REICHERT, T. E., WATKINS, S. & WHITESIDE, T. L. 2005. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res*, 11, 1010-20.
- KIM, L. C., SONG, L. & HAURA, E. B. 2009. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 6, 587-95.
- KNAUL, F. M., NIGENDA, G., LOZANO, R., ARREOLA-ORNELAS, H., LANGER, A. & FRENK, J. 2008. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod Health Matters*, 16, 113-23.
- KREGER, B. T., DOUGHERTY, A. L., GREENE, K. S., CERIONE, R. A. & ANTONYAK, M. A. 2016. Microvesicle Cargo and Function Changes upon Induction of Cellular Transformation. *J Biol Chem*, 291, 19774-85.
- LAULAGNIER, K., GRAND, D., DUJARDIN, A., HAMDY, S., VINCENT-SCHNEIDER, H., LANKAR, D., SALLES, J. P., BONNEROT, C., PERRET, B. & RECORD, M. 2004. PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett*, 572, 11-4.
- LEAL-ORTA, E., RAMIREZ-RICARDO, J., CORTES-REYNOSA, P., GALINDO-HERNANDEZ, O. & SALAZAR, E. P. 2019a. Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells treated with extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid. *J Cell Commun Signal*, 13, 235-244.
- LEAL-ORTA, E., RAMIREZ-RICARDO, J., CORTES-REYNOSA, P., GALINDO-HERNANDEZ, O. & SALAZAR, E. P. 2019b. Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells treated with extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid. *J Cell Commun Signal*.
- LEE, T. H., CHENNAKRISHNAIAH, S., AUDEMARD, E., MONTERMINI, L., MEEHAN, B. & RAK, J. 2014. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 451, 295-301.

- LI, X. J., REN, Z. J., TANG, J. H. & YU, Q. 2017. Exosomal MicroRNA MiR-1246 Promotes Cell Proliferation, Invasion and Drug Resistance by Targeting CCNG2 in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 44, 1741-1748.
- LIEM, M., ANG, C. S. & MATHIVANAN, S. 2017. Insulin Mediated Activation of PI3K/Akt Signalling Pathway Modifies the Proteomic Cargo of Extracellular Vesicles. *Proteomics*, 17.
- LIN, R., WANG, S. & ZHAO, R. C. 2013. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Mol Cell Biochem*, 383, 13-20.
- LUGA, V. & WRANA, J. L. 2013. Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res*, 73, 6843-7.
- MAAS, S. L. N., BREAKEFIELD, X. O. & WEAVER, A. M. 2017. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol*, 27, 172-188.
- MACIAS, H. & HINCK, L. 2012. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1, 533-57.
- MACLENNAN, M. & MA, D. W. 2010. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12, 211.
- MAHDAVI, M., NASSIRI, M., KOOSHYAR, M. M., VAKILI-AZGHANDI, M., AVAN, A., SANDRY, R., PILLAI, S., LAM, A. K. & GOPALAN, V. 2019. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *J Cell Physiol*, 234, 5741-5750.
- MCCAWLEY, L. J. & MATRISIAN, L. M. 2000. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*, 6, 149-56.
- MCPHERSON, K., STEEL, C. M. & DIXON, J. M. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, 321, 624-8.
- MECKES, D. G., JR., SHAIR, K. H., MARQUITZ, A. R., KUNG, C. P., EDWARDS, R. H. & RAAB-TRAUB, N. 2010. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20370-5.

- MEDEIROS, B., GOODALE, D., POSTENKA, C., LOWES, L. E., KISER, P., HEARN, S., SALMOND, N., WILLIAMS, K. C. & ALLAN, A. L. 2020. Triple-Negative Primary Breast Tumors Induce Supportive Premetastatic Changes in the Extracellular Matrix and Soluble Components of the Lung Microenvironment. *Cancers (Basel)*, 12.
- MINEO, M., GARFIELD, S. H., TAVERNA, S., FLUGY, A., DE LEO, G., ALESSANDRO, R. & KOHN, E. C. 2012. Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis*, 15, 33-45.
- MITRA, S. K., HANSON, D. A. & SCHLAEPFER, D. D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 56-68.
- MITRA, S. K. & SCHLAEPFER, D. D. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 516-23.
- MORELLO, M., MINCIACCHI, V. R., DE CANDIA, P., YANG, J., POSADAS, E., KIM, H., GRIFFITHS, D., BHOWMICK, N., CHUNG, L. W., GANDELLINI, P., FREEMAN, M. R., DEMICHELIS, F. & DI VIZIO, D. 2013. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle*, 12, 3526-36.
- MURALIDHARAN-CHARI, V., CLANCY, J. W., SEDGWICK, A. & D'SOUZA-SCHOREY, C. 2010. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, 123, 1603-11.
- 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.
- NAITO, Y., YOSHIOKA, Y., YAMAMOTO, Y. & OCHIYA, T. 2017. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 74, 697-713.
- 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.
- O'BRIEN, K., RANI, S., CORCORAN, C., WALLACE, R., HUGHES, L., FRIEL, A. M., MCDONNELL, S., CROWN, J., RADOMSKI, M. W. & O'DRISCOLL, L. 2013. Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. *Eur J Cancer*, 49, 1845-59.
- PARK, M. J., PARK, I. C., HUR, J. H., RHEE, C. H., CHOE, T. B., YI, D. H., HONG, S. I. & LEE, S. H. 2000. Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Lett*, 290, 201-4.
- PEINADO, H., ALECKOVIC, M., LAVOTSHKIN, S., MATEI, I., COSTA-SILVA, B., MORENO-BUENO, G., HERGUETA-REDONDO, M., WILLIAMS, C., GARCIA-SANTOS, G., GHAJAR, C., NITADORI-HOSHINO, A., HOFFMAN, C., BADAL, K., GARCIA, B. A., CALLAHAN, M. K., YUAN, J., MARTINS, V. R., SKOG, J., KAPLAN, R. N., BRADY, M. S., WOLCHOK, J. D., CHAPMAN, P. B., KANG, Y., BROMBERG, J. & LYDEN, D. 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 18, 883-91.
- PEROU, C. M., SORLIE, T., EISEN, M. B., VAN DE RIJN, M., JEFFREY, S. S., REES, C. A., POLLACK, J. R., ROSS, D. T., JOHNSEN, H., AKSLEN, L. A., FLUGE, O., PERGAMENSCHIKOV, A., WILLIAMS, C., ZHU, S. X., LONNING, P. E., BORRESEN-DALE, A. L., BROWN, P. O. & BOTSTEIN, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-52.
- PLACE, A. E., JIN HUH, S. & POLYAK, K. 2011. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res*, 13, 227.

- POLYAK, K. & KALLURI, R. 2010. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003244.
- RAMIREZ-RICARDO, J., LEAL-ORTA, E., MARTINEZ-BAEZA, E., ORTIZ-MENDOZA, C., BRETON-MORA, F., HERRERA-TORRES, A., ELIZALDE-ACOSTA, I., CORTES-REYNOSA, P., THOMPSON-BONILLA, R. & PEREZ SALAZAR, E. 2020. Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDAMB231 breast cancer cells. *Mol Med Rep*, 22, 1932-1948.
- RAPOSO, G. & STORVOGEL, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200, 373-83.
- REYES, N., REYES, I., TIWARI, R. & GELIEBTER, J. 2004. Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett*, 209, 25-35.
- ROBLES-CASTILLO, J., RUVALCABA-LIMON, E., MAFFUZ, A. & RODRIGUEZ-CUEVAS, S. [Breast cancer in Mexican women under 40]. *Ginecol Obstet Mex*, 79, 482-8.
- RODRIGUEZ, M. A., WARD, L. M. & PEREZ-STABLE, E. J. 2005. Breast and cervical cancer screening: impact of health insurance status, ethnicity, and nativity of Latinas. *Ann Fam Med*, 3, 235-41.
- RONTOGIANNI, S., SYNADAKI, E., LI, B., LIEFAARD, M. C., LIPS, E. H., WESSELING, J., WU, W. & ALTELAAR, M. 2019. Proteomic profiling of extracellular vesicles allows for human breast cancer subtyping. *Commun Biol*, 2, 325.
- SAFAEI, R., LARSON, B. J., CHENG, T. C., GIBSON, M. A., OTANI, S., NAERDEMANN, W. & HOWELL, S. B. 2005. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, 4, 1595-604.
- SALAZAR, E. P. & ROZENGURT, E. 2001. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *J Biol Chem*, 276, 17788-95.

- SAVINA, A., FURLAN, M., VIDAL, M. & COLOMBO, M. I. 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*, 278, 20083-90.
- SENATOROV, I. S. & MONIRI, N. H. 2018. The role of free-fatty acid receptor-4 (FFA4) in human cancers and cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*, 150, 170-180.
- SERNA-MARQUEZ, N., DIAZ-ARAGON, R., REYES-URIBE, E., CORTES-REYNOSA, P. & SALAZAR, E. P. 2017. Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Med Oncol*, 34, 111.
- SERNA-MARQUEZ, N., VILLEGAS-COMONFORT, S., GALINDO-HERNANDEZ, O., NAVARRO-TITO, N., MILLAN, A. & SALAZAR, E. P. 2013. 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 (Dordr)*, 36, 65-77.
- SHEDDEN, K., XIE, X. T., CHANDAROY, P., CHANG, Y. T. & ROSANIA, G. R. 2003. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res*, 63, 4331-7.
- SHI, J., REN, Y., ZHEN, L. & QIU, X. 2015. Exosomes from breast cancer cells stimulate proliferation and inhibit apoptosis of CD133+ cancer cells in vitro. *Mol Med Rep*, 11, 405-9.
- SHTAM, T., NARYZHNY, S., SAMSONOV, R., KARASIK, D., MIZGIREV, I., KOPYLOV, A., PETRENKO, E., ZABRODSKAYA, Y., KAMYSHINSKY, R., NIKITIN, D., SOROKIN, M., BUZDIN, A., GIL-HENN, H. & MALEK, A. 2019. Plasma exosomes stimulate breast cancer metastasis through surface interactions and activation of FAK signaling. *Breast Cancer Res Treat*, 174, 129-141.
- SIMOPOULOS, A. P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233, 674-88.

- SINGH, R., POCHAMPALLY, R., WATABE, K., LU, Z. & MO, Y. Y. 2014. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer*, 13, 256.
- 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.
- STERNLICHT, M. D. & WERB, Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 463-516.
- SULZMAIER, F. J., JEAN, C. & SCHLAEPFER, D. D. 2014. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer*, 14, 598-610.
- TARABOLETTI, G., D'ASCENZO, S., BORSOTTI, P., GIAVAZZI, R., PAVAN, A. & DOLO, V. 2002. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, 160, 673-80.
- THERY, C., AMIGORENA, S., RAPOSO, G. & CLAYTON, A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3 22.
- THERY, C., ZITVOGEL, L. & AMIGORENA, S. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2, 569-79.
- TURTURICI, G., TINNIRELLO, R., SCONZO, G. & GERACI, F. 2014. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306, C621-33.
- VALADI, H., EKSTROM, K., BOSSIOS, A., SJOSTRAND, M., LEE, J. J. & LOTVALL, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.
- VAN JAARVELD, M. T., HOUTHUIJZEN, J. M. & VOEST, E. E. 2016. Molecular mechanisms of target recognition by lipid GPCRs: relevance for cancer. *Oncogene*, 35, 4021-35.

- VILLEGAS-COMONFORT, S., CASTILLO-SANCHEZ, R., SERNA-MARQUEZ, N., CORTES-REYNOSA, P. & SALAZAR, E. P. 2014. Arachidonic acid promotes migration and invasion through a PI3K/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 90, 169-77.
- WANG, H. X. & GIRES, O. 2019. Tumor-derived extracellular vesicles in breast cancer: From bench to bedside. *Cancer Lett*, 460, 54-64.
- WEBB, D. J., DONAIS, K., WHITMORE, L. A., THOMAS, S. M., TURNER, C. E., PARSONS, J. T. & HORWITZ, A. F. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*, 6, 154-61.
- WEI, Y., LAI, X., YU, S., CHEN, S., MA, Y., ZHANG, Y., LI, H., ZHU, X., YAO, L. & ZHANG, J. 2014. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 147, 423-31.
- XU, R., GREENING, D. W., ZHU, H. J., TAKAHASHI, N. & SIMPSON, R. J. 2016. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest*, 126, 1152-62.
- XUE, G. & HEMMINGS, B. A. 2013. PKB/Akt-dependent regulation of cell motility. *J Natl Cancer Inst*, 105, 393-404.
- YANEZ-MO, M., SILJANDER, P. R., ANDREU, Z., ZAVEC, A. B., BORRAS, F. E., BUZAS, E. I., BUZAS, K., CASAL, E., CAPPELLO, F., CARVALHO, J., COLAS, E., CORDEIRO-DA SILVA, A., FAIS, S., FALCON-PEREZ, J. M., GHOBRIAL, I. M., GIEBEL, B., GIMONA, M., GRANER, M., GURSEL, I., GURSEL, M., HEEGAARD, N. H., HENDRIX, A., KIERULF, P., KOKUBUN, K., KOSANOVIC, M., KRALJ-IGLIC, V., KRAMER-ALBERS, E. M., LAITINEN, S., LASSER, C., LENER, T., LIGETI, E., LINE, A., LIPPS, G., LLORENTE, A., LOTVALL, J., MANCEK-KEBER, M., MARCILLA, A., MITTELBRUNN, M., NAZARENKO, I., NOLTE-'T HOEN, E. N., NYMAN, T. A., O'DRISCOLL, L., OLIVAN, M., OLIVEIRA, C., PALLINGER, E., DEL PORTILLO, H. A., REVENTOS, J., RIGAU, M., ROHDE, E., SAMMAR, M., SANCHEZ-MADRID, F., SANTAREM, N., SCHALLMOSER, K.,

- OSTENFELD, M. S., STLOORVOGEL, W., STUKELJ, R., VAN DER GREIN, S. G., VASCONCELOS, M. H., WAUBEN, M. H. & DE WEVER, O. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 4, 27066.
- 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.
- ZHANG, X., YUAN, X., SHI, H., WU, L., QIAN, H. & XU, W. 2015. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol*, 8, 83.
- ZHAO, Z., FAN, J., HSU, Y. S., LYON, C. J., NING, B. & HU, T. Y. 2019. Extracellular vesicles as cancer liquid biopsies: from discovery, validation, to clinical application. *Lab Chip*, 19, 1114-1140.

XV. ANEXOS

XV. 1. Role of Src/FAK in migration and invasion promoted by extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid

Javier Ramirez-Ricardo¹, Elizabeth Leal-Orta¹, Alejandra Garcia-Hernandez¹,
Ricardo Diaz-Aragon¹, Pedro Cortes-Reynosa¹, Rocio Thompson-Bonilla² and
Eduardo Perez Salazar¹

Departamento de Biología Celular¹, Cinvestav-IPN. Hospital 1o de Octubre-
ISSSTE². Ciudad de Mexico. Mexico

Corresponding Author:

Eduardo Perez Salazar, PhD

Departamento de Biología Celular

Cinvestav-IPN

Av. IPN # 2508

Ciudad de Mexico 07360

Mexico

Telephone: 52 -55- 5747-3991

Fax number: 52 -55- 5747-3393

E-mail: eduardo.perez@cinvestav.mx

Abstract

Purpose: Linoleic acid (LA) is the most abundant polyunsaturated fatty acid in occidental diets. LA plays a role in several cellular processes in human breast cancer cells, including migration and invasion. Extracellular vesicles (EVs) are composed of a variety of molecules, including proteins, nucleic acids and lipids. EVs released from cancer cells promote processes related with cancer progression. The present study investigated whether treatment of MDA-MB-231 breast cancer cells with LA induced the secretion of EVs that activated signal transduction pathways to mediate migration and invasion.

Methods: EVs were characterized using nanoparticle tracking analysis, transmission electron microscopy and Western blotting (WB). EV-induced migration and invasion were studied using scratch-wound and invasion Transwell assays. EVs uptake was evaluated by flow cytometer and confocal microscopy. Gelatinases secretions were measured using zymography, and focal adhesion assembly was analyzed using confocal microscopy. Src, FAK and Akt2 activation were studied using WB.

Results: The present study demonstrated that stimulation of MDA-MB-231 cells with EVs secreted by MDA-MB-231 cells stimulated with LA (LA EVs) promoted migration and invasion. LA EVs increased the phosphorylation of Src, FAK and Akt2. LA EVs also induced the assembly of focal contacts and MMP-9 secretion. Treatment with the selective Src family kinase inhibitor PP-2 markedly reduced LA EVs-induced migration and invasion, and the phosphorylation of FAK-Tyr397 and FAK-Tyr577.

Conclusion: These findings demonstrated that LA EVs mediated an autocrine and/or paracrine Src/FAK signaling pathway to promote migration and invasion.

Keywords: Extracellular vesicles; Linoleic acid; Src; FAK; Akt2; Migration; Invasion; MDA-MB-231; Breast cancer.

Introduction

Breast cancer is the most prevalent neoplasia and the leading cause of deaths associated with cancer in women worldwide. In 2018 was estimated that 2.1 million women were newly diagnosed with breast cancer, and a mortality of 626,679 cases (Bray et al., 2018). Epidemiological studies demonstrate that the consumption of Western diets, which is characterized by a low consumption of omega-3 fatty acids, and a high consumption of omega-6 fatty acids is associated with a higher risk of develop several cancer types, including breast cancer (Simopoulos, 2008). Linoleic acid (LA) is an essential omega-6 polyunsaturated fatty acid that represents the most abundant polyunsaturated fatty acid in occidental diets (Calder, 2001). Moreover, LA induces an increase of phospholipase D activity and a variety of cellular processes, such as migration and invasion in human breast cancer cells, and an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process in the human mammary nontumorigenic epithelial cells MCF10A (Byon et al., 2009, Diaz-Aragon et al., 2019, Espinosa-Neira et al., 2011, Serna-Marquez et al., 2017, Serna-Marquez et al., 2013).

Intercellular communication is mediated via cell-cell contact and by the transfer of secreted molecules, which play a pivotal role in tumor progression. However, a third mechanism of intercellular communication mediated by the transfer of extracellular vesicles (EVs) has been described (Polyak and Kalluri, 2010, Place et al.). EVs are vesicles derived from endosomes and plasma membrane that are composed of a variety of molecules, including proteins, nucleic acids and lipids (Lee et al., 2014, Al-Nedawi et al., 2008, Fedele et al., 2015, Kahlert et al., 2014, Morello et al., Valadi et al., 2007, Brzozowski et al., 2018). The EVs are classified by size and origin into three types: microvesicles (100-1000 nm) are a heterogeneous group

of vesicles generated at the plasma membrane; exosomes (30-100 nm) are a homogeneous group of vesicles derived from multivesicular bodies; and apoptotic bodies (1-5 μm) are derived from apoptotic cells (Raposo and Stoorvogel, 2013). Moreover, EVs released from cancer cells play critical roles in cancer initiation, progression and metastasis, because they mediate cell migration and invasion, an EMT process, remodeling of the extracellular matrix, angiogenesis and priming of the premetastatic niche (Abak et al., 2018, Zhang et al., 2015, Galindo-Hernandez et al., 2014, Costa-Silva et al., 2015, Peinado et al., 2012, Wang and Gires, 2019). Particularly, breast cancer cells MDA-MB-231 stimulated with LA release EVs that promote an EMT process in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A (Galindo-Hernandez et al., 2014, Leal-Orta et al., 2019b).

Cell migration and invasion require the activation of signal transduction pathways that mediate remodeling of the cytoskeleton (Jiang et al., 2009). Focal adhesion kinase (FAK) and Src are kinases that regulate various cellular processes in normal and cancer cells, such as proliferation, angiogenesis and migration. Formation of the FAK/Src complex is a point of convergence of a variety of signal transduction pathways, including the Ras-MAPK and PI3K-Akt pathway (Mitra and Schlaepfer, 2006). FAK activation involves its phosphorylation at tyrosine (Tyr)397, which generates a binding site for the SH2 domain of a variety of proteins including the Src family kinases. During formation of FAK/Src complex, Src phosphorylates FAK at additional Tyr residues including Tyr576 and Tyr577, which mediate maximal activation of FAK (Calalb et al., 1995). The FAK/Src complex modulates the assembly and disassembly of focal adhesions, which play a pivotal role in cell migration via binding and activation of a variety of proteins, including paxillin and

p130Cas (Bellis et al., 1995, Webb et al., 2004).

The present study demonstrate that EVs released from MDA-MB-231 cells stimulated with LA promote the activation of Src, FAK and Akt2 in MDA-MB-231 cells. EVs induce an increase in metalloproteinase (MMP)-9 secretion, the assembly of focal adhesions, migration and invasion. Collectively, the results demonstrate that EVs promote migration and invasion via Src/FAK in MDA-MB-231 breast cancer cells.

Materials and methods

Reagents

LA sodium salt (98% purity; cat. no. L8134) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). CD63 antibody (Ab) MEM-259 (cat. no. ab8219) was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Flotillin-2 Ab (cat. no. 610383) and basement membrane matrix (BD Matrigel; cat. no. 354263) were purchased from BD Biosciences (Bedford, MA, USA). FAK Ab D-1 (cat. no. sc-271126), Src Ab 17AT28 (cat. no. sc-130124), Akt2 Ab F-7 (cat. no. sc5270), MHC-1 Ab BRA23/9 (cat. no. sc-66205), ECL (cat. no. sc-2048) and Hoechst dye (cat. no. sc-394039) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Phospho-specific Abs to Tyr397 (anti-p-FAK-Tyr397; cat. no. 44-624G) and Tyr577 (anti-p-FAK-Tyr577; cat. no. 44-614G) of FAK were purchased from Invitrogen (Camarillo, CA, USA). Phospho-specific Ab to Tyr418 of Src (anti-p-Src; cat. no. AF2685) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, USA). Phospho-specific Ab to serine (Ser)473/Ser474 of Akt1/Akt2 (Anti-p-Akt-Ser; cat. no. 9271s) was purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Actin Ab was donated by Dr. Manuel Hernandez

(Cinvestav-IPN, Mexico). PP2 (cat. no. 529573) was purchased from Merck (San Diego, CA, USA).

Cell culture

MDA-MB-231 breast cancer cells were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in 35-mm, 60-mm and 100-mm cell culture plates in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (cat. No. 12800017; Gibco, ThermoFisher Scientific, Inc) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 3.7 g/l sodium bicarbonate and antibiotics under a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. At the end of incubation and before treatment, the cell densities were 1.5x10⁶ cells/35-mm plate, 4x10⁶ cells/60-mm plate and 8x10⁶ cells/100-mm plate. The cells were serum-starved in DMEM for 24 h before treatment with LA and/or EVs.

MDA-MB-231 cells were free of mycoplasma and they were authenticated by using STR profiling (National Institute of Genomic Medicine, Mexico).

LA preparation

LA stock solution (90 mM) was prepared as follows. LA sodium salt was dissolved in ethanol, flushed with nitrogen gas, protected from light and stored at -20 °C for no more than 60 days. The LA stock solution was added to the plates containing serum-free DMEM to obtain a concentration of 90 μM LA.

Stimulation of MDA-MB-231 cells with LA

Confluent cell culture plates of MDA-MB-231 cells (8×10^6 cells/100-mm culture plate) were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and 7 ml of serum-free DMEM were added to 100-mm culture plates and equilibrated at 37° for 30 min. LA stock solution was added to serum-free DMEM (final concentration 90 μ M LA), and cultures were incubated at 37 °C for 12, 24, 36 and 48 h in a humidified atmosphere with 95% air and 5% CO₂. At the end of incubation, the conditioned media were collected, and EV isolation was performed (Fig. 1a).

Isolation of EVs from conditioned media of MDA-MB-231 cells

Isolation of EVs from conditioned media was performed as described previously (They et al., 2006). One volume of 14 ml conditioned media was centrifuged at 600xg for 20 min at 4 °C to remove cells. Supernatants were centrifuged at 2,000xg for 20 min at 4 °C to remove large debris and once at 10,000xg for 30 min at 4 °C to remove residual membranous debris and apoptotic bodies. The remaining supernatants were subjected to ultracentrifugation at 110,000xg for 70 min at 4 °C, and pellets were reconstituted in PBS or serum-free DMEM (EV fractions). The absolute number of EVs was determined using flow cytometry in BD Trucount™ tubes (BD Biosciences) (Galindo-Hernandez et al., 2014).

Treatment of MDA-MB-231 cells with EVs

After starvation, MDA-MB-231 cells cultured in 35-mm culture plates (1.5×10^6 cell/plate) and 60-mm culture plates (4×10^6 cells/60-mm culture plate) were washed twice with PBS and incubated in serum-free DMEM for different time periods

with EV fractions (~52,450 EVs/experimental condition) obtained from conditioned media of MDA-MB-231 cells untreated or treated with 90 μ M LA (Fig. 1a).

Transmission electron microscopy (TEM)

An isolated fraction of EVs (~52,450 EVs) was suspended in 100 μ l sterile PBS, and then an aliquot of 30 μ l was adsorbed for 5 min on carbon-coated copper grids with mesh formvar (0.3%) at room temperature. Grids were stained with uranyl acetate solution (2%) for 30 sec and excess fluid was removed at room temperature. Grids were air-dried and analyzed using a JEM-1400 transmission electron microscope (JEOL, Ltd. Japan), equipped with a digital camera Veleta (Olympus SIS. Germany), and used at 80 kV.

Nanoparticle tracking analysis (NTA)

NTA was used to determine the size distribution of EV fractions. EV fractions (~52,450 EVs/experimental condition) were suspended in 14 ml of filtered PBS and analyzed using a NanoSight NS300 (Malvern instruments, Ltd. UK) equipped with a 488-nm laser and sCMOS camera. Three videos of each sample were captured at a duration of 60 sec, and data were analyzed using NTA 3.0 software (Malvern Instruments, Ltd. UK).

Western blotting (WB)

MDA-MB-231 cells cultured in 35-mm culture plates (1.5×10^6 cell/plate) were lysed with 0.1 ml of ice-cold RIPA buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 0.1% SDS, 1 mM sodium

orthovanadate, 10 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 100 mM NaF, 1% Triton X-100, 1mM EGTA, 1% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 1.5 mM MgCl₂ and 150 mM NaCl). Protein concentrations of each sample were determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Equal amounts of protein (40 µg/lane) were separated using 10% SDS-PAGE followed by a transfer of proteins to membranes of nitrocellulose. Membranes of nitrocellulose were blocked at room temperature with 5% nonfat dried milk in PBS (pH 7.2/0.1% Tween 20; wash buffer). The membranes of nitrocellulose were incubated with primary Ab at 4°C overnight, washed three times with wash buffer, incubated at room temperature for 2 h with a secondary Ab conjugated with horseradish peroxidase, and washed again with wash buffer three times. For protein detection, membranes were incubated for 1 min with WB luminol reagent (cat no. sc-2048; Santa Cruz Biotechnology; Inc) followed by exposition to autoradiography film (cat. no. sc-201696; Santa Cruz Biotechnology; Inc). For quantification, autoradiograms were scanned and the bands were analyzed using the ImageJ software version 1.52e (National Institute of Health).

Immunoprecipitation (IP)

Cell lysates were clarified via centrifugation at 13,500xg for 10 min at 4 °C. Supernatants were transferred to fresh tubes, and proteins were immunoprecipitated overnight at 4 °C with protein A-agarose linked with a specific Ab against the target protein. Immunoprecipitates were washed three times with RIPA buffer, and proteins were analyzed using WB.

EV uptake assays using flow cytometer

EV uptake assays were performed as described previously (Galindo-Hernandez et al., 2015, Kawamoto et al., 2012). EV fractions (~52,450 EVs/experimental condition) were stained via incubation with a CellMask Orange dye solution (2.5 µg/ml; cat. No. C10045; ThermoFisher Scientific, Inc.) for 30 min at 4 °C. EV fractions were washed with PBS by centrifugation at 110,000xg for 70 min at 4 °C and reconstituted in 100 µl serum-free DMEM. Cultures of MDA-MB-231 cells (1.5x10⁶ cells/condition) were incubated with stained EVs for 20 min at 37 °C, and the cells were washed twice with PBS and fixed with a solution of 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. The cells were incubated with a solution of 0.1% trypsin for 10 min at room temperature, washed twice with PBS and resuspended in PBS-1% BSA. The cells were analyzed using a BD FACS Calibur™ flow cytometer (BD Biosciences), and data analysis was performed using Summit 4.3 software (Beckman Coulter, Inc). The values of fluorescence intensities of each condition were analyzed using the GraphPad Prism software version 6.01.

EV uptake assays using confocal microscopy

MDA-MB-231 cells on coverslips (1.5x10⁵ cells/coverslip) were washed with PBS, equilibrated in serum-free DMEM and incubated with EV fractions (~52,450 EVs/experimental condition) for 20 min at 37 °C. Cells were washed twice with PBS, fixed with a solution of 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature and washed again twice with PBS. Cells were counterstained with Hoechst for 20 min at room temperature and mounted on glass slides using Vectashield. Preparations

were analyzed using confocal microscopy (Model TCS SP; Leica Microsystem, Inc.).

Immunofluorescence confocal microscopy

Coverslips were placed in a glass petri dish with a disc of filter paper on the bottom and the petri dish was sterilized using an autoclave. On sterile condition coverslips were placed on 35-mm culture plates and MDA-MB-231 cells were seeded on them. After 24 h of incubation, coverslips with MDA-MB-231 cells (1.5×10^5 cells/coverslip) were washed with PBS, equilibrated in DMEM, and incubated at 37 °C for 30 min with EV fractions (~52,450 EVs/experimental condition). Cells were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde, permeabilized for 20 min with 0.5% Triton X-100 and blocked with FBS (10%) dissolved in PBS for 1 h at room temperature. Cells were incubated for 12 h at 4 °C with anti-p-FAK-Tyr397 Ab (1:250) and then incubated at room temperature for 2 h with FITC-labeled anti-mouse secondary Ab. Fibrillar actin was stained by incubation for 2 h at 4 °C with TRITC-conjugated phalloidin (Thermo Fisher Scientific Inc.). Images from at least 3 fields per experimental condition were captured using a confocal microscope (Model TCS SP2; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and analyzed using ImageJ software v1.52e (National Institutes of Health).

Scratch-wound assay

Confluent cell cultures of MDA-MB-231 cells (1.5×10^6 cells/35-mm culture plate) were pretreated with 40 µM mitomycin C for 2 h at 37 °C to prevent proliferation throughout all the experiment. Cell culture plates with MDA-MB-231 cells were

scratched, washed twice with PBS and supplied with serum-free DMEM supplemented with or without inhibitors and/or EV fractions (~52,450 EVs/experimental condition) for 48 h at 37 °C. At the end of incubation, cell culture plates were photographed using an inverted microscope coupled to a camera (FSX100; Olympus Corporation; magnification 100x). Images from at least 3 fields per experimental condition were captured and analyzed with the ImageJ software version 1.52e (National Institutes of Health). One control of cell migration was included (5% FBS).

Zymography

Conditioned media from MDA-MB-231 cells cultured in 60-mm culture plates (4×10^6 cells/60-mm culture plate) untreated or treated with EV fractions (~52,450 EVs/experimental condition) for 6, 9, 12, 18 and 24 h at 37° were concentrated using 5,000 Da Centricon® filters. An equal volume (12 µl) of nonheated conditioned medium and sample buffer (2.5% SDS, 1% sucrose and 4 µg/ml phenol red) was mixed, and samples were loaded onto 8% polyacrylamide gels copolymerized with gelatin (1 mg/ml). Gels were rinsed three times with 2.5% Triton X-100 for 30 min and incubated at 37 °C for 48 h in assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM CaCl₂). Polyacrylamide gels were simultaneously fixed and stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolved in 10% acetic acid and 30% methanol. Unstained areas on a blue background corresponded to proteolytic activity. Controls of MMP-2 and MMP-9 secretion were included, which were obtained via the treatment of MDA-MB-231 cells with 400 mg/dl ethanol (EtOH) and 100 ng/ml phorbol-12,13-dibutyrate for 24 h at 37 °C (Ke et al., 2006, Park et al., 2000).

Invasion assays

Inserts (upper chamber) of 24-well plates (Costar; Corning, Inc) were covered with 50 μ l Matrigel (3 mg/ml) and incubated for 2 h at 37 °C. Next, 1×10^5 MDA-MB-231 cells in serum-free DMEM were plated on Matrigel of each insert, and the lower chamber contained 600 μ l serum-free DMEM with EV fractions (~52,450 EVs/experimental condition). Plates with the inserts were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air for 72 h. Matrigel and cells on the upper surface of the insert membranes were extracted with cotton swabs, and cells on membranes were washed with PBS followed by fixation for 12 min at room temperature with 4% paraformaldehyde. Images of cells were obtained using an inverted microscope coupled to a camera (FSX100, Olympus Corporation; magnification 400x). Quantification of invaded cells was determined via staining of the membranes with 0.5% crystal violet dissolved in PBS for 15 min at room temperature, and elution of the dye with 300 μ l acetic acid solution (30%). Absorbance of the collected solution was measured at 600 nm. A positive control of invasion was incorporated that was obtained via treatment of cells with FBS (5%).

Statistical analysis

At least two technical repeats and three independent biological repeats were performed for each study. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test using the SPSS Statistics software version 26 and GraphPad Prism version 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, USA). All data are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.). Statistical probability below of $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) was considered significant.

Results

Characterization of EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells

EV fractions from MDA-MB-231 cells incubated with serum-free DMEM for 48 h (Ctrl EVs) and EV fractions from cells stimulated with 90 μ M LA for 48 h (LA EVs) were characterized using TEM, NTA and WB against CD63, MHC-1 and Flot-2, which are protein markers associated with EVs. TEM and NTA showed a population of spherical vesicles with sizes between 50-539 nm in Ctrl EVs, and LA EVs showed a more heterogeneous population with vesicles between 50-456 nm (Fig. 1b, c and d). WB demonstrated the presence of CD63, MHC-1 and Flot-2 in Ctrl EVs and LA EVs (Fig. 1e).

EVs from conditioned media of MDA-MB-231 cells stimulated with LA induce migration and invasion

To investigate whether LA EVs enhanced the migration of MDA-MB-231 cells, EVs from MDA-MB-231 cells untreated and treated with 90 μ M LA for 12, 24, 36 and 48 h were isolated. Migration assays were performed using scratch-wound assays with MDA-MB-231 cells treated with Ctrl EVs or EVs from cells exposed with 90 μ M LA for 12, 24, 36 and 48 h. The results indicated that only EVs from cells exposed to LA for various periods of time (12-48 h) induced migration, and stimulation of cells with Ctrl EVs did not induce migration in MDA-MB-231 cells (Fig. 2a). Since stimulation of MDA-MB-231 cells with EVs from cells exposed to 90 μ M LA for 24-48 h induced the maximum of migration, the following experiments were performed with EVs from cells exposed to 90 μ M LA for 48 h.

To determine whether LA EVs enhanced invasion in MDA-MB-231 cells,

invasion assays were performed with MDA-MB-231 cells treated with Ctrl EVs and LA EVs. The results showed that only treatment with LA EVs enhanced the invasion of MDA-MB-231 cells (Fig 2b).

Invasion involves the secretion of matrix metalloproteinases (Place et al., 2011). To investigate whether treatment of MDA-MB-231 cells with EVs enhanced the secretion of MMP-2 and MMP-9, conditioned media from MDA-MB-231 cells stimulated for 6, 9, 12, 18 and/or 24 h with Ctrl EVs and LA EVs were analyzed using gelatin zymography. The findings showed that unstimulated cells and cells stimulated with Ctrl EVs secreted basal levels of MMP-9, and stimulation with LA EVs for 18 and 24 h enhanced the secretion of MMP-9 in MDA-MB-231 cells (Fig. 2c). Interestingly, stimulation of MDA-MB-231 cells with Ctrl EVs induced an inhibition of MMP-2 secretion compared to unstimulated cells, and treatment with LA EVs induced an increase in MMP-2 secretion compared to Ctrl EVs (Fig. 2c).

EVs secreted from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induce Src, FAK and Akt2 activation

To determine whether stimulation of MDA-MB-231 cells with LA EVs induced Src, FAK and Akt2 activation, which are mediated by phosphorylation at Tyr418, Tyr397/Tyr577 and Ser474, respectively, MDA-MB-231 cells were stimulated for various periods of time with Ctrl EVs and LA EVs, and lysates were examined using WB with anti-p-Src-Tyr418 and anti-p-FAK-Tyr397. The results revealed that stimulation of MDA-MB-231 cells with LA EVs induced an increase in the phosphorylation of Src at Tyr418 and FAK at Tyr397 (Fig. 3a and b). Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Akt2 Ab and analyzed by WB with anti-p-Akt-

Ser474. Findings revealed that stimulation with LA EVs induced an increase in the phosphorylation of Akt2 at Ser474 in MDA-MB-231 cells (Fig. 3c).

EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induce focal adhesion assembly

To investigate whether stimulation of MDA-MB-231 cells with LA EVs induced focal adhesion assembly, MDA-MB-231 cells on coverslips were stimulated with Ctrl EVs and LA EVs, and the assembly of focal adhesions was analyzed using immunofluorescence with an anti-p-FAK-Tyr397 Ab because FAK phosphorylated at Tyr397 is localized in focal adhesions (Webb et al., 2004). MDA-MB-231 cells unstimulated and stimulated with Ctrl EVs showed a similar amount of focal adhesions, and stimulation with LA EVs induced an increase in the amount and then assembly of focal adhesions (Fig. 4).

Role of Src in FAK and Akt2 activation

The role of Src was examined using PP2, which is a specific inhibitor of Src family members (Hanke et al., 1996). To determine whether PP2 inhibited Src activity, MDA-MB-231 cells were treated with 10 μ M PP2 for 1 h, stimulated with Ctrl EVs and LA EVs and lysed. Cell lysates were analyzed using WB with an anti-p-Src-Tyr418 Ab. Results showed that treatment with PP2 inhibited the increase in the phosphorylation of Src at Tyr418 (Fig. 5a).

To determine the role of Src in FAK and Akt2 activation, MDA-MB-231 cells were treated with 10 μ M PP2 for 1 h, stimulated with Ctrl EVs and LA EVs for 20 min and lysed. FAK activation was analyzed using WB with an anti-p-FAK-Tyr397 Ab

and anti-p-FAK-Tyr577 Ab, and Akt2 activation was analyzed using immunoprecipitation of cell lysates with an anti-Akt2 Ab and WB with an anti-p-Akt2-Ser474 Ab. Treatment with PP2 inhibited FAK phosphorylation at Tyr397 and Tyr577 (Fig. 5 b and c), however PP2 did not inhibit Akt2 phosphorylation at Ser474 in MDA-MB-231 cells (Fig. 5d).

EVs induce migration and invasion via Src activity in MDA-MB-231 cells

To determine whether Src activity mediated the migration and invasion induced by LA EVs, migration and invasion assays were performed using MDA-MB-231 cells treated with 10 μ M PP2 for 1 h and stimulated with Ctrl EVs and LA EVs. The results showed that treatment with PP2 inhibited LA EVs-induced migration and invasion of MDA-MB-231 cells (Fig. 6a and b).

MDA-MB-231 cells take up EVs

To determine whether MDA-MB-231 cells take up Ctrl EVs and LA EVs and the role of Src activity, Ctrl EVs and LA EVs were stained with CellMask Orange dye, and MDA-MB-231 cells were treated with 10 μ M PP2 for 1 h then incubated for 20 min with unstained LA EVs, stained Ctrl EVs and stained LA EVs. The fluorescence intensity of MDA-MB-231 cells was analyzed using flow cytometry and confocal microscopy. Findings showed that fluorescence intensity was higher in MDA-MB-231 cells stimulated with stained Ctrl EVs and stained LA EVs compared to cells stimulated with unstained LA EVs. Comparison of fluorescence intensity was not significantly different between the values obtained from cells stimulated with stained Ctrl EVs and the value obtained from cells stimulated with stained LA EVs (Fig. 7a

and b). Treatment with PP2 did not inhibit the increase in fluorescence intensity induced by stimulation with stained LA EVs in MDA-MB-231 cells (Fig. 7a and b).

Discussion

The role of fatty acids in the risk and development of breast cancer is controversial, because ω -3 fatty acids are associated with an anti-tumor activity, whereas the ω -6 fatty acids are related with a pro-tumor activity (Chajes et al., 2012, Murff et al., 2011, Azrad et al., 2013). Notably, two ω -3 fatty acids, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), and the EVs from breast cancer cells stimulated with DHA inhibit tumor progression in mammary tumors and tube formation in endothelial cells (Khadge et al., 2018, Hannafon et al., 2015). In contrast, two ω -6 fatty acids, the arachidonic acid and LA, induce migration and invasion in breast cancer cells (Byon et al., 2009, Galindo-Hernandez et al., 2014, Leal-Orta et al., 2019b, Serna-Marquez et al., 2017, Villegas-Comonfort et al., 2014). LA is an important source of energy and the most abundant fatty acid in Western diets (Calder, 2001), that mediates a variety of cell processes in breast cancer cells, including proliferation, migration and invasion, via G protein-coupled receptors (Reyes et al., 2004, Senatorov and Moniri, 2018, Serna-Marquez et al., 2017, Yonezawa et al., 2004). EVs released from conditioned media of MDA-MB-231 cells treated with 90 μ M LA promote an EMT process via PI3K/Akt in MCF10A cells (Galindo-Hernandez et al., 2014, Leal-Orta et al., 2019b). This study hypothesized that treatment of MDA-MB-231 cells with 90 μ M LA induces the release of EVs that mediate migration and invasion via an autocrine/paracrine signaling pathway in MDA-MB-231 cells.

EVs are constituted of exosomes and microvesicles, which are a variety of vesicles with sizes between 30-1000 nm (Raposo and Stoorvogel, 2013). The present study isolate and characterize Ctrl EVs and LA EVs, and the results demonstrate that EV fractions are composed of vesicles between 50-500 nm, which express proteins associated with exosomes and microvesicles. Therefore, EV fractions isolated are composed of exosomes and microvesicles, and the fractions do not contain cell debris and apoptotic bodies. NTA demonstrate that Ctrl EVs and LA EVs are composed of a variety of populations of vesicles of different sizes. These results demonstrate that stimulation of MDA-MB-231 cells with LA induce the enrichment and generation of different populations of EVs compared to untreated cells.

It has been demonstrated that LA induces migration and invasion, and that EVs from breast cancer women induce migration and invasion in MDA-MB-231 cells (Serna-Marquez et al., 2017, Serna-Marquez et al., 2013, Ramirez-Ricardo et al., 2020). The present results demonstrate that only LA EVs induce migration and invasion in MDA-MB-231 cells. Therefore, MDA-MB-231 cells stimulated with LA release EVs that mediate an autocrine and/or paracrine communication between the MDA-MB-231 cells. These results strongly suggest that MDA-MB-231 cells in response to LA induce the release of different populations of EVs with a variety of cargos, and some of these cargos induce activation of signal transduction pathways that promote migration and invasion in MDA-MB-231 cells.

Cell migration and invasion are critical steps in the metastasis process, and involve the activation of a variety of cellular mechanisms, including the reorganization of the actin cytoskeleton and the assembly of focal adhesions (Jiang

et al., 2009, Polyak and Kalluri, 2010). Migration and invasion are mediated via intracellular signaling pathways, including the PI3K/Akt pathway, and cytosolic kinases (Src and FAK), which are integrators of external signals, such as growth factors, chemokines and cytokines (Jiang et al., 2009). However, few studies describe the signal transduction pathways induced by EVs from cells treated with a fatty acid and their role in cell migration and invasion. The present study demonstrate that LA EVs induce activation of Src, FAK and Akt2 in a time-dependent manner in MDA-MB-231 cells. FAK activation requires the activity of Src, but Akt2 activation does not require the Src activity induced by LA EVs. It is proposed that MDA-MB-231 cells treated with LA release a heterogeneous population of EVs with a variety of cargos that activate different signal transduction pathways that mediate different cell processes, including EVs uptake, migration and invasion via an autocrine and/or paracrine mechanism in MDA-MB-231 cells.

Degradation of ECM is an essential process during invasion and metastasis. The EVs play an important role in invasion and metastasis because these vesicles contain a variety of molecules including MMPs, such as MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and their zymogens (Dolo et al., 1998, Muralidharan-Chari et al., 2010). In this study, the results demonstrate that LA EVs induce an increase in MMP-2 and MMP-9 secretion, and invasion in MDA-MB-231 cells. It is proposed that breast cancer cells stimulated with LA release EVs that contain molecules involved in the invasion/metastasis process, including MMPs, and that EVs induce the expression of molecules related with the invasion/metastasis process in target cells, including integrins and MMPs. In agreement with this proposal, EVs from tumor cells transfer bioactive molecules to their target cells, including nucleic acids (microRNA, mRNA

and DNA) and proteins (transcription factors, growth factors receptors and other cytosolic and transmembrane proteins) (Al-Nedawi et al., 2008, DeRita et al., 2017, Fedele et al., 2015, Kanada et al., 2016, Lee et al., 2014). Moreover, EVs from breast cancer patients carry FAK and epidermal growth factor receptor (EGFR) proteins (Galindo-Hernandez et al., 2013).

EVs are released and taken up by a variety of cells, including breast cancer cells (Galindo-Hernandez et al., 2014, Leal-Orta et al., 2019b). MDA-MB-231 cells take up EVs via endocytosis mediated by an interaction between integrin beta 3 expressed on EVs and the heparan sulfate proteoglycans present on plasmatic membrane and activation of FAK (Fuentes et al., 2020). The present findings demonstrate that MDA-MB-231 cells take up Ctrl EVs and LA EVs. However, only the LA EVs enhance migration, invasion and an enhance of MMP-2 and MMP-9 secretion. The results also demonstrate that Src activity does not mediate the uptake of LA EVs in MDA-MB-231 cells. These findings strongly suggest that MDA-MB-231 cells in response to LA induces changes in the biogenesis, lipid composition and cargo of EVs compared to EVs released from unstimulated cells. Furthermore, it is proposed that machinery of internalization of Ctrl EVs and LA EVs is similar and mediated by expression of integrin beta 3 on EVs and heparan sulfate proteoglycans on plasmatic membrane, and it requires the activity of FAK and is independent of Src activity in MDA-MB-231 cells.

LA, via FFAR1 and/or FFAR4, and EGFR transactivation, mediates migration, invasion, an increase in intracellular Ca^{2+} concentration, activation of PLD and activation of the PI3K/Akt pathway in breast cancer cells (Diaz-Aragon et al., 2019, Serna-Marquez et al., 2017, Yonezawa et al., 2004). It is proposed that treatment of

MDA-MB-231 cells with LA, via FFAR1 and/or FFAR4, PLD activity and activation of PI3/Akt pathway, mediates the biogenesis, secretion and cargo in EVs released for these cells. In support of this proposal, ionomycin induces the translocation of PLD2 from plasma membrane to intracellular compartments, and PLD2 activity correlates with the release of exosomes in RBL-2H3 cells (Laulagnier et al., 2004). Insulin treatment modifies the cargo of EVs via PI3K/Akt activation in colorectal cancer cells, but an increase in intracellular calcium increases the secretion of exosomes in the human erythroleukemia cells K562 (Savina et al., 2003, Laulagnier et al., 2004).

EVs released from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induce activation of Akt2, FAK and ERK1/2 in MCF10A cells, and EVs from plasma of breast cancer women induce FAK/Src activation, and migration via Src activity in MDA-MB-231 cells (Leal-Orta et al., 2019b, Ramirez-Ricardo et al., 2020). It is proposed that EVs released from MDA-MB-231 cells stimulated with LA contain cargos, such as fibronectin and integrin beta 3, that induce activation of proteins on plasmatic membranes of target cells including heparan sulfate proteoglycans, and then signal transduction pathways, including the activation of Src and FAK, which mediate the reorganization of cytoskeleton and then migration and invasion in MDA-MB-231 cells. Supporting this proposal, MDA-MB-231 cells and U87 glioma cells release EVs containing tissue transglutaminase and fibronectin, which confer onto normal fibroblasts and epithelial cells the capacity of anchorage independent growth and the enhance of survival (Antonyak et al., 2011). EVs from MDA-MB-231 cells and IMR90 fibroblasts promote clonal growth in MDA-MB-231 cells via expression of integrin beta 3 on EVs (Fuentes et al., 2020).

Conclusions

This study demonstrates that treatment of MDA-MB-231 cells with LA promotes the release of EVs that activate signal transduction pathways, including the activation of FAK and Src, which mediated an increase of MMP-2 and MMP-9 secretion, focal adhesion assembly, migration and invasion via an autocrine and/or paracrine communication in MDA-MB-231 cells. It describes a novel mechanism of communication mediated by treatment of MDA-MB-231 cells with LA, and these findings strongly suggest that LA EVs play an important role in the invasion and metastasis process in breast cancer. Moreover, these findings will contribute to the design of new strategies for breast cancer treatment and diets for the prevention of breast cancer progression.

Abbreviations

EVs: Extracellular Vesicles; FAK: Focal Adhesion Kinase; LA: Linoleic Acid; FA: Fatty Acid; EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition; FBS: Fetal Bovine Serum; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; NTA: Nanoparticle Tracking Analysis; TEM: Transmission Electron Microscopy; PBS: Phosphate Buffered Saline; Akt: Protein Kinase B; PP2: pyrazolopyrimidine 2; EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; EPA: Eicosapentaenoic Acid; DHA: Docosahexaenoic Acid; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase; EtOH: Ethanol; ANOVA: Analysis of variance.

Acknowledgments

We are grateful to Nora Ruiz and María de Lourdes-Rojas (LaNSE, Cinvestav-IPN) for their technical assistance.

Funding

This research was funded by CONACYT (255429) and CONACYT-FOSISS (Salud 2015-1-261637), Mexico. Grants from CONACYT supported JRR, ELO, AGH and RDA.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this article.

Authors' contributions

JRR designed the study and wrote the manuscript. JRR and ELO performed the experiments and analyses. AGH, RDA and PCR validated the data and reviewed/edited the manuscript. EPS, RTB and JRR coordinated the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Abak A, Abhari A, Rahimzadeh S (2018) Exosomes in cancer: small vesicular transporters for cancer progression and metastasis, biomarkers in cancer therapeutics PeerJ 6:e4763 doi:10.7717/peerj.4763
- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells Nat Cell Biol 10:619-624 doi:ncb1725 [pii] 10.1038/ncb1725
- Antonyak MA et al. (2011) Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells Proc Natl Acad Sci U S A 108:4852-4857 doi:10.1073/pnas.1017667108
- Azrad M, Turgeon C, Demark-Wahnefried W (2013) Current evidence linking polyunsaturated Fatty acids with cancer risk and progression Front Oncol 3:224 doi:10.3389/fonc.2013.00224
- Bellis SL, Miller JT, Turner CE (1995) Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase J Biol Chem 270:17437-17441
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries CA: a cancer journal for clinicians 68:394-424 doi:10.3322/caac.21492

Brzozowski JS et al. (2018) Lipidomic profiling of extracellular vesicles derived from prostate and prostate cancer cell lines *Lipids Health Dis* 17:211 doi:10.1186/s12944-018-0854-x

10.1186/s12944-018-0854-x [pii]

Byon CH, Hardy RW, Ren C, Ponnazhagan S, Welch DR, McDonald JM, Chen Y (2009) Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4 *Lab Invest* 89:1221-1228 doi:labinvest200997 [pii]

10.1038/labinvest.2009.97

Calalb MB, Polte TR, Hanks SK (1995) Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases *Mol Cell Biol* 15:954-963

Calder PC (2001) Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity *Lipids* 36:1007-1024 doi:10.1007/s11745-001-0812-7

Costa-Silva B et al. (2015) Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver *Nat Cell Biol* 17:816-826 doi:ncb3169 [pii]

10.1038/ncb3169

Chajes V et al. (2012) omega-3 and omega-6 Polyunsaturated fatty acid intakes and the risk of breast cancer in Mexican women: impact of obesity status *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21:319-326 doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0896

DeRita RM, Zerlanko B, Singh A, Lu H, Iozzo RV, Benovic JL, Languino LR (2017) c-Src, Insulin-Like Growth Factor I Receptor, G-Protein-Coupled Receptor Kinases and Focal Adhesion Kinase are Enriched Into Prostate Cancer Cell Exosomes *Journal of cellular biochemistry* 118:66-73 doi:10.1002/jcb.25611

- Diaz-Aragon R, Ramirez-Ricardo J, Cortes-Reynosa P, Simoni-Nieves A, Gomez-Quiroz LE, Perez Salazar E (2019) Role of phospholipase D in migration and invasion induced by linoleic acid in breast cancer cells *Mol Cell Biochem* 457:119-132 doi:10.1007/s11010-019-03517-8
- Dolo V et al. (1998) Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells *Cancer Res* 58:4468-4474
- Espinosa-Neira R, Mejia-Rangel J, Cortes-Reynosa P, Salazar EP (2011) Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A *Int J Biochem Cell Biol* 43:1782-1791 doi:10.1016/j.biocel.2011.08.017
- Fedele C, Singh A, Zerlanko BJ, Iozzo RV, Languino LR (2015) The alpha6beta6 integrin is transferred intercellularly via exosomes *J Biol Chem* 290:4545-4551 doi:C114.617662 [pii]
10.1074/jbc.C114.617662
- Fuentes P et al. (2020) ITGB3-mediated uptake of small extracellular vesicles facilitates intercellular communication in breast cancer cells *Nat Commun* 11:4261 doi:10.1038/s41467-020-18081-9
- Galindo-Hernandez O et al. (2015) Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36:9649-9659 doi:10.1007/s13277-015-3711-9
- Galindo-Hernandez O, Serna-Marquez N, Castillo-Sanchez R, Salazar EP (2014) Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with

- linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells Prostaglandins
Leukot Essent Fatty Acids 91:299-310 doi:S0952-3278(14)00146-X [pii]
10.1016/j.plefa.2014.09.002
- Galindo-Hernandez O et al. (2013) Elevated concentration of microvesicles isolated
from peripheral blood in breast cancer patients Archives of medical research
44:208-214 doi:10.1016/j.arcmed.2013.03.002
- Hanke JH et al. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine
kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation J Biol
Chem 271:695-701
- Hannafon BN, Carpenter KJ, Berry WL, Janknecht R, Dooley WC, Ding WQ (2015)
Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by
the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA) Mol Cancer 14:133
doi:10.1186/s12943-015-0400-7
- Jiang P, Enomoto A, Takahashi M (2009) Cell biology of the movement of breast
cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton Cancer Lett
284:122-130 doi:S0304-3835(09)00127-X [pii]
10.1016/j.canlet.2009.02.034
- Kahlert C et al. (2014) Identification of double-stranded genomic DNA spanning all
chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of
patients with pancreatic cancer J Biol Chem 289:3869-3875 doi:C113.532267
[pii]
10.1074/jbc.C113.532267

- Kanada M, Bachmann MH, Contag CH (2016) Signaling by Extracellular Vesicles
Advances Cancer Hallmarks Trends in cancer 2:84-94
doi:10.1016/j.trecan.2015.12.005
- Kawamoto T et al. (2012) Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic
phenotype in endothelial cells via endocytosis PloS one 7:e34045
doi:10.1371/journal.pone.0034045
- Ke Z et al. (2006) MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial
cells over-expressing ErbB2 Int J Cancer 119:8-16 doi:10.1002/ijc.21769
- Khadge S et al. (2018) Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease
mammary tumor growth, multiorgan metastasis and enhance survival Clin
Exp Metastasis 35:797-818 doi:10.1007/s10585-018-9941-7
- Laulagnier K et al. (2004) PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated
to the release of exosomes FEBS Lett 572:11-14
doi:10.1016/j.febslet.2004.06.082
- Leal-Orta E, Ramirez-Ricardo J, Cortes-Reynosa P, Galindo-Hernandez O, Salazar
EP (2019) Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells
treated with extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with
linoleic acid J Cell Commun Signal doi:10.1007/s12079-018-0490-2
10.1007/s12079-018-0490-2 [pii]
- Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, Montermini L, Meehan B, Rak J (2014)
Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-
stranded DNA capable of interacting with target cells Biochem Biophys Res
Commun 451:295-301 doi:S0006-291X(14)01358-8 [pii]
10.1016/j.bbrc.2014.07.109

- Mitra SK, Schlaepfer DD (2006) Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells *Curr Opin Cell Biol* 18:516-523 doi:S0955-0674(06)00122-0 [pii] 10.1016/j.ceb.2006.08.011
- Morello M et al. (2013) Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA *Cell Cycle* 12:3526-3536 doi:26539 [pii] 10.4161/cc.26539
- Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression *J Cell Sci* 123:1603-1611 doi:10.1242/jcs.064386
- Murff HJ et al. (2011) Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study *Int J Cancer* 128:1434-1441 doi:10.1002/ijc.25703
- Park MJ et al. (2000) Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells *Neuroscience letters* 290:201-204 doi:10.1016/s0304-3940(00)01358-6
- Peinado H et al. (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET *Nat Med* 18:883-891 doi:nm.2753 [pii] 10.1038/nm.2753
- Place AE, Jin Huh S, Polyak K (2011) The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment *Breast Cancer Res* 13:227 doi:bcr2912 [pii] 10.1186/bcr2912

Polyak K, Kalluri R (2010) The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a003244 doi:cshperspect.a003244 [pii]

10.1101/cshperspect.a003244

Ramirez-Ricardo J et al. (2020) Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDAMB231 breast cancer cells Molecular medicine reports 22:1932-1948 doi:10.3892/mmr.2020.11259

Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends J Cell Biol 200:373-383 doi:jcb.201211138 [pii]

10.1083/jcb.201211138

Reyes N, Reyes I, Tiwari R, Geliebter J (2004) Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D Cancer Lett 209:25-35 doi:10.1016/j.canlet.2003.12.010

S0304383503008516 [pii]

Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells J Biol Chem 278:20083-20090 doi:10.1074/jbc.M301642200

Senatorov IS, Moniri NH (2018) The role of free-fatty acid receptor-4 (FFA4) in human cancers and cancer cell lines Biochemical pharmacology 150:170-180 doi:10.1016/j.bcp.2018.02.011

Serna-Marquez N, Diaz-Aragon R, Reyes-Urbe E, Cortes-Reynosa P, Salazar EP (2017) Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and

PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells *Med Oncol* 34:111 doi:10.1007/s12032-017-0969-3

10.1007/s12032-017-0969-3 [pii]

Serna-Marquez N, Villegas-Comonfort S, Galindo-Hernandez O, Navarro-Tito N, Millan A, Salazar EP (2013) 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 (Dordr)* 36:65-77 doi:10.1007/s13402-012-0114-4

Simopoulos AP (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases *Experimental biology and medicine* 233:674-688 doi:10.3181/0711-MR-311

They C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3 22 doi:10.1002/0471143030.cb0322s30

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells *Nat Cell Biol* 9:654-659 doi:ncb1596 [pii]

10.1038/ncb1596

Villegas-Comonfort S, Castillo-Sanchez R, Serna-Marquez N, Cortes-Reynosa P, Salazar EP (2014) Arachidonic acid promotes migration and invasion through a PI3K/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 90:169-177 doi:10.1016/j.plefa.2014.01.007

- Wang HX, Gires O (2019) Tumor-derived extracellular vesicles in breast cancer: From bench to bedside *Cancer Lett* 460:54-64 doi:10.1016/j.canlet.2019.06.012
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly *Nat Cell Biol* 6:154-161 doi:10.1038/ncb1094
ncb1094 [pii]
- Yonezawa T, Katoh K, Obara Y (2004) Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7 *Biochem Biophys Res Commun* 314:805-809 doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.175
- Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W (2015) Exosomes in cancer: small particle, big player *Journal of hematology & oncology* 8:83 doi:10.1186/s13045-015-0181-x

Figure legends

Fig. 1 Characterization of EVs from MDA-MB-231 cells. **a** Workflow of the assays used in this study. **b** Transmission electron microscopy (TEM) of negatively stained EVs. *Scale bar = 50 nm*. **c** and **d** Nanoparticle tracking analysis (NTA) of EVs secreted from MDA-MB-231 cells treated for 48 h with serum-free DMEM (Ctrl EVs), and EVs secreted from MDA-MB-231 cells stimulated with 90 μ M LA for 48 h (LA EVs). **e** WB with anti-CD63 Ab, anti-MHC-I Ab and anti-Flotillin-2 (Flot-2) Ab of conditioned medium (CM), Ctrl EVs and LA EVs. n=3.

Fig 2. EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA enhance migration and invasion. **a** Confluent cultures of MDA-MB-231 cells were scratch-wounded and incubated for 48 h with Ctrl EVs and EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with 90 μ M LA for 12, 24, 36 and 48 h. Magnification 100x. **b** Invasion assays of MDA-MB-231 cells stimulated with Ctrl EVs and LA EVs. Controls of unstimulated MDA-MB-231 cells incubated for 72 h with serum-free DMEM (Ctrl) and cells treated with FBS are included. **c** Gelatin zymography of conditioned media from MDA-MB-231 cells stimulated with Ctrl EVs and LA EVs for 6, 9, 12, 18 and/or 24 h. Controls of conditioned medium from MDA-MB-231 cells treated with serum-free DMEM for 24 h (Ctrl), and positive controls of MMP-2 (EtOH) and MMP-9 (PDB) secretions are included. Graphs represent the means \pm SD and indicate the fold-changes in migration or invasion above Ctrl EV value. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl EVs. *** $P < 0.001$. n=3.

Fig. 3 EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induce activation of Src, FAK and Akt2. **a**, and **b** Lysates from MDA-MB-231 cells stimulated for various periods of time with Ctrl EVs and LA EVs were examined using WB with anti-p-FAK-Tyr397 Ab and anti-p-Src-Tyr418 Ab. Membranes were further tested with anti-Src Ab, anti FAK Ab and anti-actin Ab as loading controls. **c** Lysates from MDA-MB-231 cells stimulated for various periods of time with Ctrl EVs and LA EVs were immunoprecipitated with anti-Akt2 Ab, and the immunoprecipitates were examined using WB with anti-p-Akt-Ser474 Ab. Membranes were further tested with anti-Akt2 Ab and anti-actin Ab as loading controls. Values of p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397 and p-Akt2-Ser474 were normalized to the actin control. Graphs represent the means \pm

SD and indicate the fold-changes of p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397 and p-Akt2-Ser474 above Ctrl EVs values. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl EVs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. n=4.

Fig. 4 EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA mediate focal adhesion assembly. Cultures of MDA-MB-231 cells were stimulated for 30 min with Ctrl EVs and LA EVs. Cells were incubated with anti-p-FAK-Tyr397 Ab and tetramethylrhodamine-conjugated phalloidin and analyzed using confocal microscopy. Images are representative of three independent experiments. Data are presented as the means \pm SD of fluorescent intensity of p-FAK-Tyr397 and as expressed as fold-change above Ctrl EVs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. n=4.

Fig. 5 Role of Src in FAK and Akt2 activation induced by the treatment with EVs secreted from MDA-MB-231 cells treated with LA. **a-c** Lysates from MDA-MB-231 cells treated with 10 μ M PP2 for 1 h and stimulated with Ctrl EVs and LA EVs for 20 min were examined using WB with Abs against p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397 and p-FAK-Tyr577. Nitrocellulose membranes were further tested with anti-Src Ab, anti FAK Ab and anti-actin Ab (loading controls). **d** Lysates from MDA-MB-231 cells treated for 1 h with 10 μ M PP2 and treated with Ctrl EVs and LA EVs for 20 min were immunoprecipitated with anti-Akt2 Ab, and the immunoprecipitates were examined using WB with anti-p-Akt-Ser474 Ab. Membranes were further tested with anti-Akt2 Ab and anti-actin Ab as loading controls. Values of p-Src-Tyr418, p-FAK-Tyr397, p-FAK-Tyr577 and p-Akt2-Ser474 were normalized to the actin control. Graphs represent the means \pm SD and indicate the fold-change of p-Src-Tyr418, p-FAK-

Tyr397, p-FAKTyr577 and p-Akt2-Ser474 above Ctrl EV values respectively. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl EVs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.
n=4.

Fig. 6 EVs secreted from MDA-MB-231 cells treated with LA promote migration and invasion via Src activity. **a** and **b** Migration and invasion assays were performed with MDA-MB-231 cells treated for 1 h with 10 μ M PP2 and stimulated with Ctrl EVs and LA EVs. Magnification of migration, 100x. Magnification of invasion, 400x. Graphs represent the means \pm SD and indicate the fold-change of migration or invasion above Ctrl EVs value. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl EVs. *** $P < 0.001$.
n=3.

Fig. 7 MDA-MB-231 cells take up EVs from unstimulated and stimulated cells with LA. **a** Flow cytometry analyses of MDA-MB-231 cells treated for 1 h with 10 μ M PP2 and stimulated with unstained LA EVs, stained Ctrl EVs and stained LA EVs. Graph represents the mean fluorescence intensities \pm SD and indicate the fold-change of fluorescence intensity above unstained LA EVs. Asterisks indicated comparisons made to unstained LA EVs. *** $P < 0.001$. **b** Confocal microscopy analysis of MDA-MB-231 cells treated for 1 h with 10 μ M PP2 and incubated with unstained LA EVs, stained Ctrl EVs and stained LA EVs. Nuclei were stained with Hoechst dye. *Scale bar = 40 μ m*. n=3.

Fig. 8. Proposed roles of EVs from conditioned media of MDA-MB-231 cells treated with LA in migration and invasion.

XV. 2. Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells

JAVIER RAMÍREZ-RICARDO¹, ELIZABETH LEAL-ORTA¹, ELIA MARTÍNEZ-BAEZA¹, CARLOS ORTIZ-MENDOZA², FERNANDO BRETON-MORA³, ANALY HERRERA-TORRES⁴, IRMA ELIZALDE-ACOSTA⁴, PEDRO CORTES-REYNOSA¹, ROCIO THOMPSON-BONILLA⁴ and EDUARDO PEREZ SALAZAR¹

¹Departament of Cell Biology, CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360; ²General Hospital Tacuba-ISSSTE, Mexico City 11410; ³General Hospital Dr. Fernando Quiroz-ISSSTE, Mexico City 01140; ⁴First October Regional Hospital-ISSSTE, Mexico City 07760, Mexico

Received December 2, 2019; Accepted May 15, 2020

DOI: 10.3892/mmr.2020.11259

Correspondence to: Dr Eduardo Perez Salazar, Departament of Cell Biology, CINVESTAV-IPN, Avenida Instituto Politécnico

Nacional 2508, Mexico City 07360, Mexico

E-mail: eduardo.perez@cinvestav.mx

Key words: extracellular vesicles, breast cancer, migration, invasion, focal adhesion kinase, Src, MDA-MB-231

Abstract. Triple negative breast cancer (TNBC) is a breast cancer subtype associated with high rates of metastasis, heterogeneity, drug resistance and a poor prognosis. Extracellular vesicles (EVs) are vesicles of endosomal and plasma membrane origin, and are secreted by healthy and cancer cells. In cancer, EVs contribute to tumor progression by mediating escape from the immune system surveillance, and are involved in extracellular matrix degradation, invasion, angiogenesis, migration and metastasis. Furthermore, EVs have been identified in several human fluids. However, the role of EVs from patients with breast cancer in the migration and invasion of human breast cancer cells is not fully understood. The present study investigated whether EVs isolated from Mexican patients with breast cancer can induce cellular processes related to invasion in breast cancer. Moreover, plasma fractions enriched in EVs and deprived of platelet-derived EVs obtained from blood samples of 32 Mexican patients with biopsy-diagnosed breast cancer at different clinical stages who had not received treatment were analyzed. Furthermore, one control group was included, which consisted of 20 Mexican healthy females. The present results demonstrated that EVs from women with breast cancer promote migration and invasion, and increase matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 secretion in TNBC MDA-MB-231 cells. In addition, it was found that EVs from patients with breast cancer induced Src and focal adhesion kinase activation, and focal adhesions assembly with an increase in focal adhesions number, while the migration and invasion was dependent on Src activity. Collectively, EVs from Mexican patients with breast cancer induce migration and invasion via a Src-dependent pathway in TNBC MDA-MB-231 cells.

Introduction

Breast cancer is the most common type of cancer in women worldwide, and is the second leading cause of cancer-associated mortality (1-3). Triple negative breast cancer (TNBC) is a breast cancer subtype associated with high rates of metastasis, heterogeneity, drug resistance and a poor prognosis. The absence of estrogen and progesterone receptors, and low expression of Her-2/neu characterizes TNBC. Moreover, the incidence of TNBC is continuously increasing in young women (4-6).

Extracellular vesicles (EVs) are vesicles derived from membranes that are secreted by healthy and cancer cells, and mediate a variety of biological functions. EVs are classified into two groups according to their origin and size: Exosomes (30-100 nm) and microvesicles (100-1,000 nm) (7). Exosomes are a homogeneous group of vesicles that originate from multivesicular bodies, while microvesicles are a heterogeneous population derived from the plasma membrane during membrane blebbing (8). Furthermore, EVs derived from tumor cells express phosphatidylserine (PS) on their membrane surfaces, and these EVs express higher levels of PS compared with EVs from healthy cells (9-11). Therefore, the quantification of PS in tumor-derived EVs is proposed as a biomarker of tumor progression (12,13).

In cancer, cells are able to transfer nucleic acids, chemokine receptors, growth factor receptors and functional transcription factors via the secretion and uptake of EVs (14). Moreover, cells associated with stroma and tumor cells release EVs that mediate a variety of processes related to cancer progression, including migration, invasion, angiogenesis, evasion of immune response, resistance to drugs and extracellular matrix (ECM) degradation (14-16). EVs are present in human fluids, including lymph, urine, breast milk, saliva, amniotic fluid, blood and malignant ascites. In

addition, in patients with gastric or breast cancer, the number of EVs circulating is higher compared with healthy controls, and these have been associated with poor prognosis (8,17-19).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of proteases that are categorized into different types based on their substrate specificity and sequence characteristics (20,21). Furthermore, MMPs are endopeptidases, which are zinc-dependent and are able to degrade all ECM components. In cancer, MMPs participate in tumor progression by mediating expansion, angiogenesis and invasion via the basement membrane (BM) and interstitial matrices (20). Moreover, cancer progression is associated with upregulation and secretion of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B), as malignant tumors overexpress these MMPs, which degrade type IV collagen, which is the most abundant component of BM (20,22,23).

Focal adhesions are the structures on which integrin receptors mediate the adhesion between the actin cytoskeleton and ECM, which are important for a variety of cellular components, including scaffolding proteins, GTPases, phosphatases and kinases (24,25). Moreover, one component of focal adhesions is the focal adhesion kinase (FAK), which is a 125 kDa protein tyrosine kinase that is activated by a variety of agonists, including free fatty acids (26-28). FAK has been implicated in the regulation of cell spreading, differentiation, proliferation, apoptosis, migration, invasion, survival and angiogenesis (29-31). Furthermore, activation of FAK occurs via its autophosphorylation at tyrosine (Tyr)-397, which creates a binding site for the Src kinase and other downstream effectors. Moreover, FAK-Src complex formation is mediated via the Src Homology 2 (SH2) domain of Src and its formation leads to Src activation. Subsequently, Src phosphorylates FAK at Tyr-576 and Tyr-577, which are localized in the activation domain, and their phosphorylation induces maximal FAK kinase activity (31,32).

The present results demonstrated that EVs isolated from the plasma of Mexican women with breast cancer promoted MMP-2 and MMP-9 secretion, Src and FAK activation, assembly of focal adhesions, and the migration and invasion of TNBC MDA-MB-231 cells

Materials and methods

Materials. BD Matrigel™ was purchased from BD Biosciences. Hoechst dye was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. CellMask™ Orange plasma membrane stain was obtained from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Tetramethylrhodamine (TRITC)-conjugated phalloidin, mitomycin C, Annexin V and Triton™ X-100 were from Sigma-Aldrich (Merck KGaA). PP2 and PP3 were from Merck KGaA.

Cell culture. MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in DMEM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), with 5% FBS (ByProducts), 3.7 g/l sodium bicarbonate and antibiotics under a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air at 37°C.

Human mammary non-tumorigenic epithelial cells (MCF12A) were obtained from ATCC and cultured in DMEM/F12 medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) with 5% FBS, 0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Merck KGaA), 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF; Sigma-

Aldrich, Merck KGaA), 10 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich, Merck KGaA) and antibiotics under a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air at 37°C.

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were serum-starved in DMEM for 24 h, and MCF12A cells were serum-starved in DMEM/F12 for 18 h before treatment with inhibitors and/or EVs.

Patients. The patients enrolled between August 2014 and December 2018 consisted of 32 unrelated women who resided in Mexico City (median age, 57.7 years; age range, 38-80 years) from the First October Regional Hospital- ISSSTE (Mexico) with biopsy-diagnosed breast cancer at clinical stages II and III, and without receiving therapy. The control group consisted of 20 healthy women (median age, 42.7 years; age range, 16-86 years) who did not have any family history of breast cancer. All study participants provided signed informed consent, and the protocol was approved by The Committee of Research, Ethics and Biosafety of the First October Regional Hospital- ISSSTE, and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The pathological and clinical information of patients with breast cancer is shown in Table I.

Preparation of human plasma and isolation of EVs. In total, 4 ml peripheral blood was collected into polypropylene tubes containing sodium citrate (Vacutainer System; BD Biosciences). Whole blood samples were centrifuged at 1,500 x g for 15 min at 4°C, and plasma samples were obtained. Isolation of EVs was performed as described previously (17). Then, one volume of 1 ml plasma was centrifuged at 3,000 x g for 30 min at 4°C to remove platelets. Plasma was obtained and centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4°C to remove apoptotic bodies and platelet EVs, and supernatants were aliquoted and frozen at -80°C until further analysis. Frozen samples were thawed on ice and centrifuged at 110,000 x g for 70 min at 4°C and pellets were reconstituted in PBS or DMEM (EV fractions). The absolute number of EVs was determined by flow cytometry using BD Trucount™ tubes (BD Biosciences) (18).

Transmission electron microscopy (TEM). TEM of EV fractions was performed as described previously (33). EV fractions were adsorbed for 5 min on carbon-coated copper grids with mesh formvar (0.3%) at room temperature. The grids were stained for 30 sec at room temperature with 2% uranyl acetate solution and excess fluid was removed. Grids were air-dried and analyzed using a JEM-1400 TEM (JEOL, Ltd.), operated at 80 kV and coupled with a digital camera Veleta (Olympus SIS).

Nanoparticle tracking analysis (NTA). NTA was used to assess the size distribution of EV fractions. EV fractions were diluted in 10 ml filtered PBS and analyzed with a NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Ltd.), which was equipped with a 488 nm laser and a sCMOS camera. Then, three videos of each sample were captured at a duration of 60 sec and data were analyzed with NTA v3.0 software (Malvern Instruments, Ltd.).

Characteristics	Patients, n
Tumor type	
<i>In situ</i> ductal carcinoma	0
<i>In situ</i> lobular carcinoma	0
Invasive ductal carcinoma	32
Primary tumor size	
T1	1
T2	20
T3	8
T4	3
Stage of breast cancer	
<i>In situ</i>	0
I	0
II	20
III	12
IV	0
Lymph node status	
Negative	0
Positive	32
Estrogen receptor status	
Negative	11
Positive	21
Her2/Neu status	
Negative	17
Positive	15
Progesterone receptor status	
Negative	16
Positive	16
Age, years	
Median	57.7
Range	38-80

Table I. Patient characteristics.

Stimulation of MDA-MB-231 cells with EVs. Cultures of MDA-MB-231 cells (1.5×10^6 cells/dish) were serum-starved for 24 h, washed twice with PBS and then stimulated at different time periods with EV fractions (20,000 EVs/ 1.5×10^6 cells/experimental condition) from patients with breast cancer and healthy women. Scratch-wound assays were performed for 48 h; invasion assays for 72 h; proliferation assays for 48; and zymography assays for 3, 6, 9, 12 and 24 h.

Western blotting. Cells and EVs were solubilized in 0.1 ml of ice-cold RIPA buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGT4, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% SDS and 1 mM PMSF). Protein concentration of each sample was determined by using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Equal amounts of protein (30 µg/lane) were separated by SDS-PAGE on a 10% gel and proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Nitrocellulose membranes were blocked for 2 h with 5% non-fat dried milk in PBS (pH 7.2/0.1% Tween 20; wash buffer) at room temperature. The membranes were incubated with the following primary antibodies at 4°C overnight: Anti-Flotillin-2 (Flot-2) antibody (Ab; Mouse monoclonal; cat. no. 610383; 1:1,000; BD Biosciences), anti-CD9 Ab C-4 (Mouse monoclonal; cat. no. sc-13118; 1:300; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-FAK Ab D-1 (Mouse monoclonal; cat. no. sc-271126; 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-c-Src Ab 17AT28 (Mouse monoclonal; cat. no. sc-130124; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-CD81 Ab EPR4244 (Rabbit monoclonal; cat. no. ab109201; 1:1,000; Abcam), anti-phosphorylated-specific Ab to Tyr-397 of FAK (anti-p-FAK Ab; Rabbit polyclonal; cat. no. 44-624G; IF 1:250; WB 1:1,000; Thermo Fisher Scientific, Inc.), anti-phosphorylated-specific Ab to Tyr-418 of Src (anti-p-Src Ab; rabbit polyclonal IgG; cat. no. AF2685; 1:1,000; R&D Systems, Inc.), anti-vinculin Ab (Rabbit polyclonal; cat. no. V4139; IF 1:250; WB 1:500; Sigma-Aldrich; Merck KGaA) and anti-actin Ab (Mouse polyclonal; 1:1,000) was provided by Dr Manuel Hernandez (Cinvestav-IPN). Subsequently, membranes were washed three times with wash buffer and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab (cat. nos. G21040 and G21234; 1:5,000; Thermo Fisher Scientific, Inc.) for 2 h at room temperature, and washed again with wash buffer three times. ECL detection reagent (cat. no. sc-2048; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and images were used for visualization of immunoreactive bands. Bands were analyzed by using the ImageJ software v1.52e (National Institute of Health).

EV uptake assays using flow cytometry. EV uptake assays were performed as described previously (34,35). EV fractions (20,000 EVs/condition) were stained via incubation for 30 min at 4°C with CellMask Orange dye solution (2.5 µg/ml). EV fractions were then washed with PBS, centrifuged at $110,000 \times g$ for 70 min at 4°C and reconstituted in 100 µl DMEM. MDA-MB-231 cells (1.5×10^6 cells/condition) were incubated for 4 h at 37°C with stained EVs, and after incubation, cells were washed twice with PBS and fixed for 20 min at room temperature with a solution of 4% paraformaldehyde. Next, cells were incubated for 10 min at room temperature with a solution of trypsin (0.1%), washed twice with PBS and re-suspended in PBS-1% BSA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Controls of inhibition of EVs uptake were included, and were obtained by treatment of EVs with 200 ng/ml Annexin V for 30 min at 4°C, before staining of EVs with CellMask Orange dye solution for 30 min at 4°C. Cells were analyzed using a BD FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences) and data analysis was performed with Summit v4.3 software (Beckman Coulter, Inc.).

EV uptake assays using confocal microscopy. MDA-MB-231 cells (1.5×10^5 cells/condition) were incubated with stained EVs (20,000/condition) for 4 h at 37°C. After incubation, cells were washed twice with PBS, fixed for 20 min at room temperature with a solution of paraformaldehyde (4%) and washed twice again with PBS. Next, cells were counterstained with Hoechst for 20 min at room temperature and mounted on glass slides using Vectashield. Preparations were analyzed by confocal microscopy (Model TCS SP2; Leica Microsystems, Inc.).

Scratch-wound assays. MDA-MB-231 cells (1.5×10^6 cells) were cultured until they reached confluency and pretreated for 2 h at 37°C with 12 μ M mitomycin C to inhibit proliferation during the experiment. Cell cultures were scratched, washed with PBS and supplemented with serum-free DMEM with or without inhibitors and/or EV fractions (20,000 EVs/condition) at 37°C. After treatment for 48 h, the cultures were imaged using an inverted microscope coupled to a camera (FSX100; Olympus Corporation; magnification, x100). Images from ≥ 3 fields per experimental condition were acquired and analyzed using ImageJ software v1.52e (National Institutes of Health). In total, one control of cell migration was included (5% FBS).

Invasion assays. Inserts of 24-well plates (Costar; Corning, Inc.) were covered with 50 μ l Matrigel (3 mg/ml) and incubated at 37°C for 2 h. Then, 1.2×10^5 MDA-MB-231 cells in serum-free DMEM were plated on Matrigel of each insert in the upper chamber, and the lower chamber contained EV fractions (20,000 EVs/condition) in 600 μ l DMEM. The plates with the inserts were incubated at 37°C for 72 h under a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air. After incubation, cells and Matrigel on the upper surface of the membrane were removed, and cells on the lower surface of the membrane were washed with PBS followed by fixation for 12 min at room temperature with 4% paraformaldehyde. After fixation, invaded cells were imaged using an inverted microscope couple to a camera (FSX100, Olympus Corporation; magnification, x400). Quantification of invaded cells was calculated by staining membranes with 0.5% crystal violet for 15 min at room temperature and elution of the dye with 300 μ l 30% acetic acid. Absorbance of the collected solution was measured at 600 nm. Cells treated with 5% FBS were included as an invasion control.

Zymography. Conditioned media from TNBC MDA-MB-231

cells (1.5×10^6 cells) treated with EV fractions (20,000 EVs/condition) at different time points (3, 6, 9, 12 and 24 h) at 37°C from women with breast cancer and healthy controls were concentrated using 5,000 Da Centricon® filters (EMD Millipore). An equal volume (12 μ l) of non-heated conditioned medium and sample buffer (2% sucrose, 2.5% SDS, 4 μ g/ml phenol red) was mixed and the samples were loaded onto 8% acrylamide gels copolymerized with gelatin (1 mg/ml). Next, gels were rinsed three times for 30 min with Triton X-100 (2.5%) and incubated in assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM CaCl₂) for 48 h at 37°C. After incubation, gels were stained for 1 h at room temperature with a solution of Coomassie Brilliant Blue G-250 (0.25%) dissolved in acetic acid (10%) and methanol (30%). Proteolytic activity was identified as white zones on a blue background. Controls of MMP-2 and MMP-9 secretions were included, which were obtained by treatment of MDA-MB-231 cells with 400 mg/dl ethanol and 100 ng/ml phorbol-12,13-dibutyrate for 24 h at 37°C, as treatment of cells with these compounds induces the expression and secretion of MMP-2 and MMP-9, respectively (36,37).

Immunofluorescence confocal microscopy. MDA-MB-231 cells (1.5×10^5 cells) were grown on coverslips, washed with PBS, equilibrated in DMEM and treated with EV fractions (20,000

EVs/condition) for 30 min at 37°C. Cells were fixed with paraformaldehyde (4%) for 20 min at room temperature, permeabilized with 0.5% Triton X-100 and then blocked for 30 min at room temperature with FBS (10%) dissolved in PBS. Next, cells were incubated overnight at 4°C with anti-p-FAK Ab (1:250) followed by FITC-labeled anti-mouse secondary Ab (cat. no. 115-095-003; Jackson ImmunoResearch, Inc) for 2 h at 4°C. Staining of focal contacts was performed by incubation of cells with anti-vinculin Ab for 12 h at 4°C, while staining of cells for fibrillar actin was performed by incubation for 2 h at 4°C with TRITC-conjugated phalloidin (cat. no. R415; Thermo Fisher Scientific, Inc.) Cells then were analyzed by confocal microscopy (Model TCS SP2; Leica Microsystems, Inc.).

Cell proliferation assay. MDA-MB-231 cells (30,000 cells per well) were treated for 48 h at 37°C with EV fractions (20,000 EVs/condition). Next, 10 µl WST-1 reagent (cat. no. ab65473; Abcam) was added to the cells in each well and microplates were incubated at 37°C for 2 h. The absorbance of each well was measured at 450 nm, and one control for proliferation was included, which was prepared by treatment of cells with 5% FBS for 48 h at 37°C.

Statistical analysis. Data are presented as the mean ± SD of ≥3 independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for ≥3 groups, while Student's t-test was used to analyze groups of two. P<0.05 was considered to indicate a statically significant difference.

Results

EVs from plasma of patients with breast cancer induce the migration of MDA-MB-231 cells. The present study characterized EV fractions using NTA, TEM and western blotting against Flot-2, CD9 and CD81, which are molecular markers associated with EVs (7). NTA and TEM results identified a population of spherical vesicles with sizes between 30-300 nm in healthy women, while women with breast cancer had vesicles between 50-600 nm (Fig. 1A and B). Moreover, NTA showed that the number of EVs was significantly higher in women with breast cancer (1.542×10^{11} EVs/ml) than in healthy women (2.14×10^{10} EVs/ml). Western blotting results demonstrated the presence of Flot-2, CD9 and CD81 protein expression in EV fractions from healthy women (Ctrl EVs) and EV fractions from women with breast cancer (BC EVs; Fig. 1C).

Next, whether BC EVs induced migration in TNBC MDA-MB-231 cells was investigated. Cell migration assays were performed using scratch-wound assays with MDA-MB-231 cells treated with EVs from 22 patients with breast cancer and from 15 healthy women. The results indicated that BC EVs induced increased migration compared with Ctrl EVs in MDA-MB-231 cells (Fig. 1D). In addition, the association between the migration induced by BC EVs in MDA-MB-231 cells and the expression levels of estrogen, progesterone and Her2/neu receptors in the mammary tumors of the women from where the plasma EVs were obtained was analyzed. It was found that the migration induced by BC

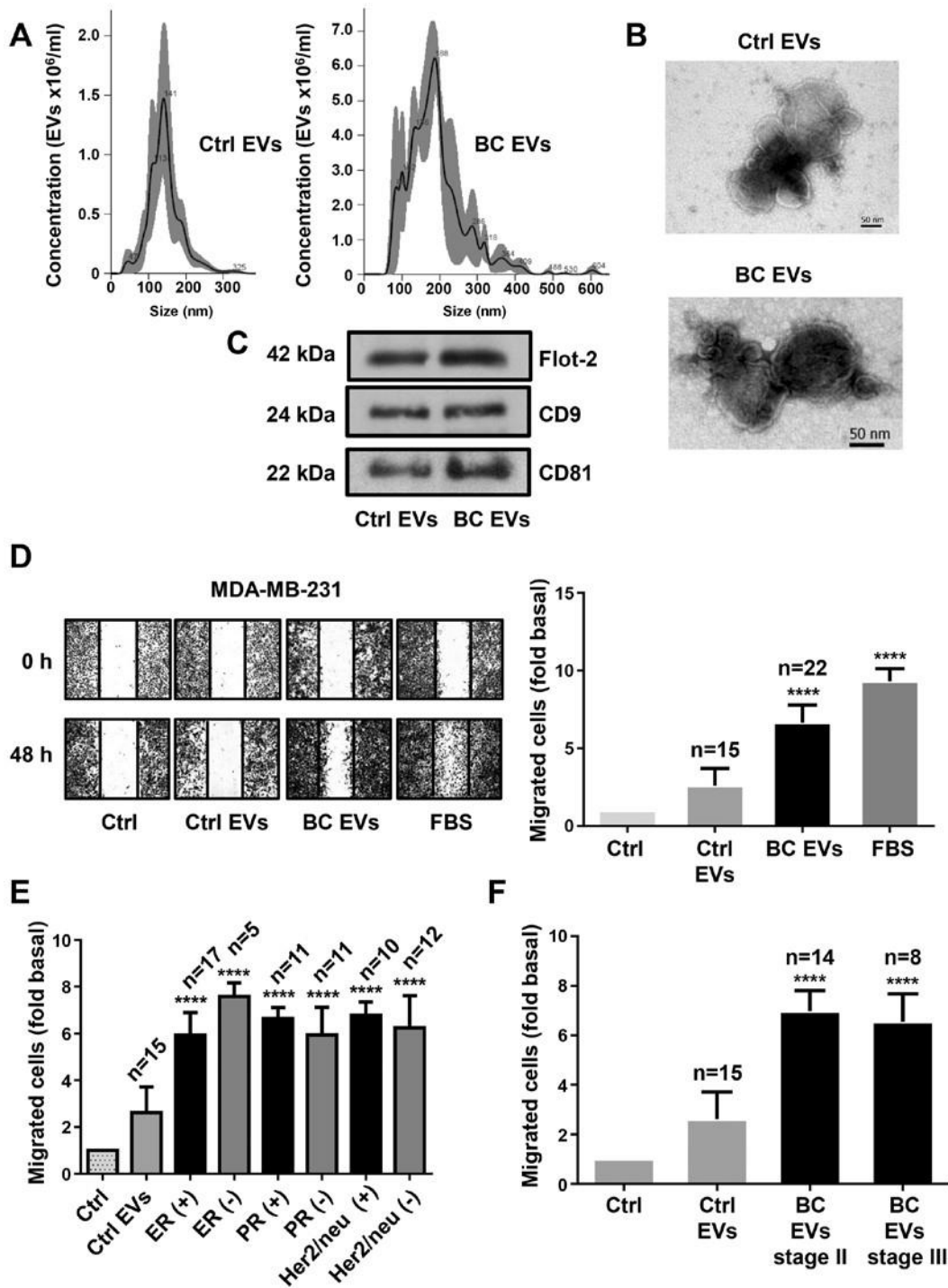


Figure 1. EVs from plasma of patients with breast cancer enhance migration in MDA-MB-231 cells. (A) Ctrl EVs and BC EVs were analyzed by nanoparticle tracking analysis. The calculated size distribution of particles was depicted as the mean (black line) with standard errors (gray shaded area). (B) Ctrl EVs and BC EVs were visualized by transmission electron microscopy. (C) Ctrl EVs and BC EVs were analyzed by western blotting with anti-Flot-2 Ab, anti-CD9 Ab and anti-CD81 Ab. Images are representative of three independent experiments. (D) Cultures of MDA-MB-231 cells were scratch-wounded and treated for 48 h with Ctrl EVs and BC EVs; one control of FBS was included. (E) Analysis of migration induced by BC EVs in relation to expression of ER, PR and Her2/neu overexpression. (F) Analysis of migration induced by BC EVs in relation to clinical stage of patients. Magnification, 100x. Data are presented as the mean \pm SD, and indicate the fold of migration above Ctrl. **** $P < 0.0001$ vs. Ctrl. Ctrl, control; Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women;

BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer; Ab, antibody; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; EVs, extracellular vesicles; Flot-2, flotillin-2.

EVs was not related with the expression levels of estrogen, progesterone and Her2/neu receptors in the tumors of women with breast cancer (Figs. 1E and S1A). Furthermore, migration of MDA-MB-231 cells induced by BC EVs was not related with the stages II and III of the women with breast cancer (Figs. 1F and S1B).

To further examine these findings, whether BC EVs induced migration and/or invasion was determined in another breast cancer cell line (MCF-7) and mammary non-tumorigenic epithelial cells (MCF12A). The results showed that treatment with BC EVs did not induce migration in MCF-7 cells, and it did not induce migration and invasion in MCF12A cells (Fig. 2A-C).

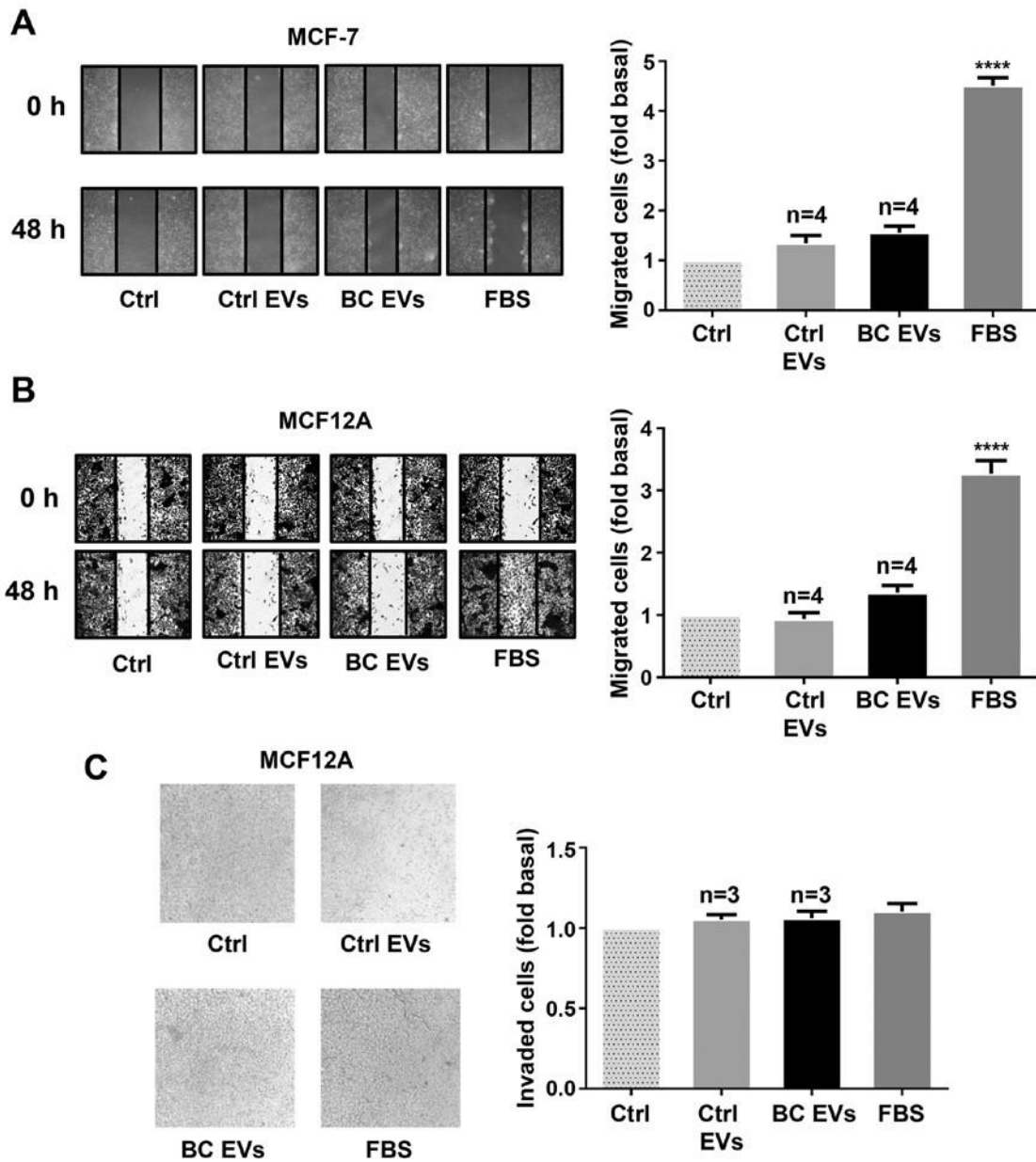


Figure 2. EVs from plasma of patients with breast cancer do not enhance migration and invasion in MCF-7 and MCF12A cells. (A and B) Cultures of MCF-7 and MCF12A cells were scratch-wounded and treated for 48 h with Ctrl EVs and BC EVs. Magnification, x100. (C) Invasion assays were performed with MCF12A cells treated with Ctrl EVs and BC EVs; one control of FBS was included. Magnification, x400. Data are presented as the mean \pm SD, and indicate the fold of migration or invasion above Ctrl. ****P<0.0001 vs. Ctrl. Ctrl, control; Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women; BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer; EVs, extracellular vesicles.

EVs from healthy women and patients with breast cancer are taken up by MDA-MB-231 cells. It was studied whether Ctrl EVs and BC EVs were taken up by MDA-MB-231 cells. Ctrl EVs and BC EVs were labeled with CellMask orange dye, MDA-MB-231 cells were incubated with unstained EVs and stained EVs, and the fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry. It was identified that fluorescence intensity was higher in MDA-MB-231 cells treated with stained Ctrl

EVs and stained BC EVs compared with MDA-MB-231 cells treated with unstained EVs (Figs. 3A and B and S2). In addition, the comparison of fluorescence intensity was not significantly different between the value obtained from MDA-MB-231 cells treated with stained BC EVs and the value obtained from MDA-MB-231 cells treated with stained Ctrl EVs (Fig. 3C).

EVs express PS on their surface, and Annexin V has a strong and specific affinity for PS (38). Controls of uptake inhibition were included, and were obtained by treatment of EVs with 200 ng/ml Annexin V, before staining of EVs with CellMask Orange dye. The results indicated that treatment of stained Ctrl EVs with Annexin V inhibited the increase of fluorescence intensity induced by stained Ctrl EVs (Fig. 3A). However, treatment of BC EVs with Annexin V did not inhibit the increased fluorescence intensity induced by stained BC EVs (Fig. 3B).

To further examine whether EVs are taken up by breast cancer cells, MDA-MB-231 cells treated with stained Ctrl EVs, stained BC EVs and unstained BC EVs were analyzed by confocal microscopy. It was found that MDA-MB-231 cells treated with stained BC EVs and stained Ctrl EVs showed a red staining, while cells treated with unstained BC EVs did not show any color (Fig. 3D).

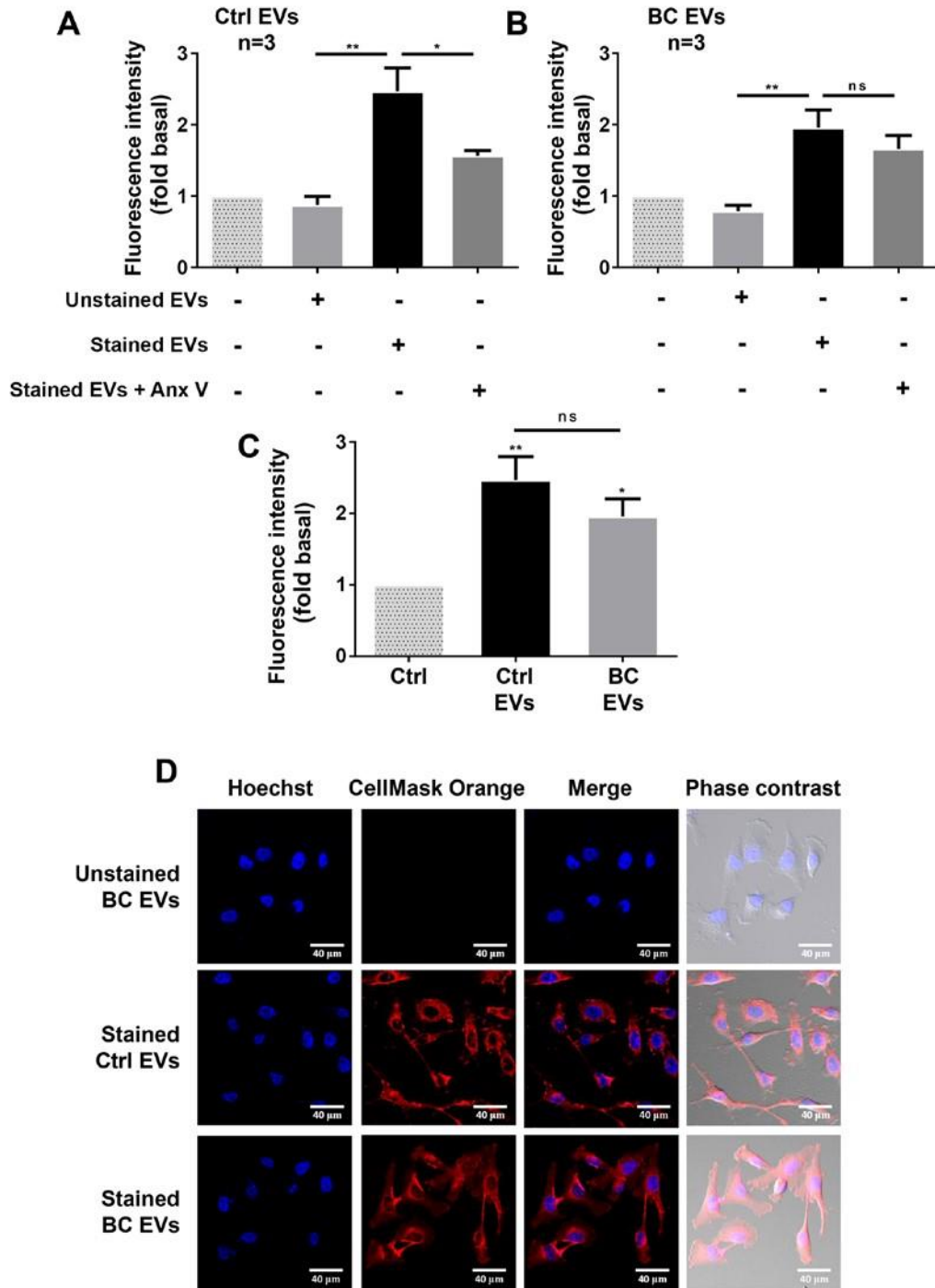


Figure 3. EVs from plasma of healthy and breast cancer groups are taken up by MDA-MB-231 cells. (A and B) Flow cytometry analysis of MDA-MB-231 cells incubated with unstained or stained Ctrl EVs and unstained or stained BC EVs. Controls of cells without treatment with EVs and uptake inhibition (Annexin V) were included. (C) Comparison of stained EVs uptake between MDA-MB-231 cells treated with stained BC EVs and stained Ctrl EVs. (D) Confocal microscopy analysis of MDA-MB-231 cells incubated with unstained BC EVs, stained Ctrl EVs, stained BC EVs and nucleus stained with Hoechst dye. Scale bar, 40 μ m. Data are presented as the mean fluorescence intensities \pm SD, and indicate the fold of fluorescence intensity above Ctrl and Ctrl EVs. $^{\#}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs. Ctrl or as indicated. ns, not significant; Ctrl, control; EVs, extracellular vesicles; Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women; BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer.

EVs from patients with breast cancer induce secretion of gelatinases. It was determined whether treatment of MDA-MB-231 cells with BC EVs induced gelatinase secretion. MDA-MB-231 cells were stimulated for 3, 6, 9, 12 and 24 h with EVs from three patients with breast cancer, and stimulated for 24 h with EVs from three healthy women. Conditioned media were obtained, concentrated and analyzed by gelatin zymography. It was identified that stimulation of MDA-MB-231 cells with BC EVs induced increased secretion of MMP-2 and MMP-9 at 12 and 24 h of treatment (Fig. 4A).

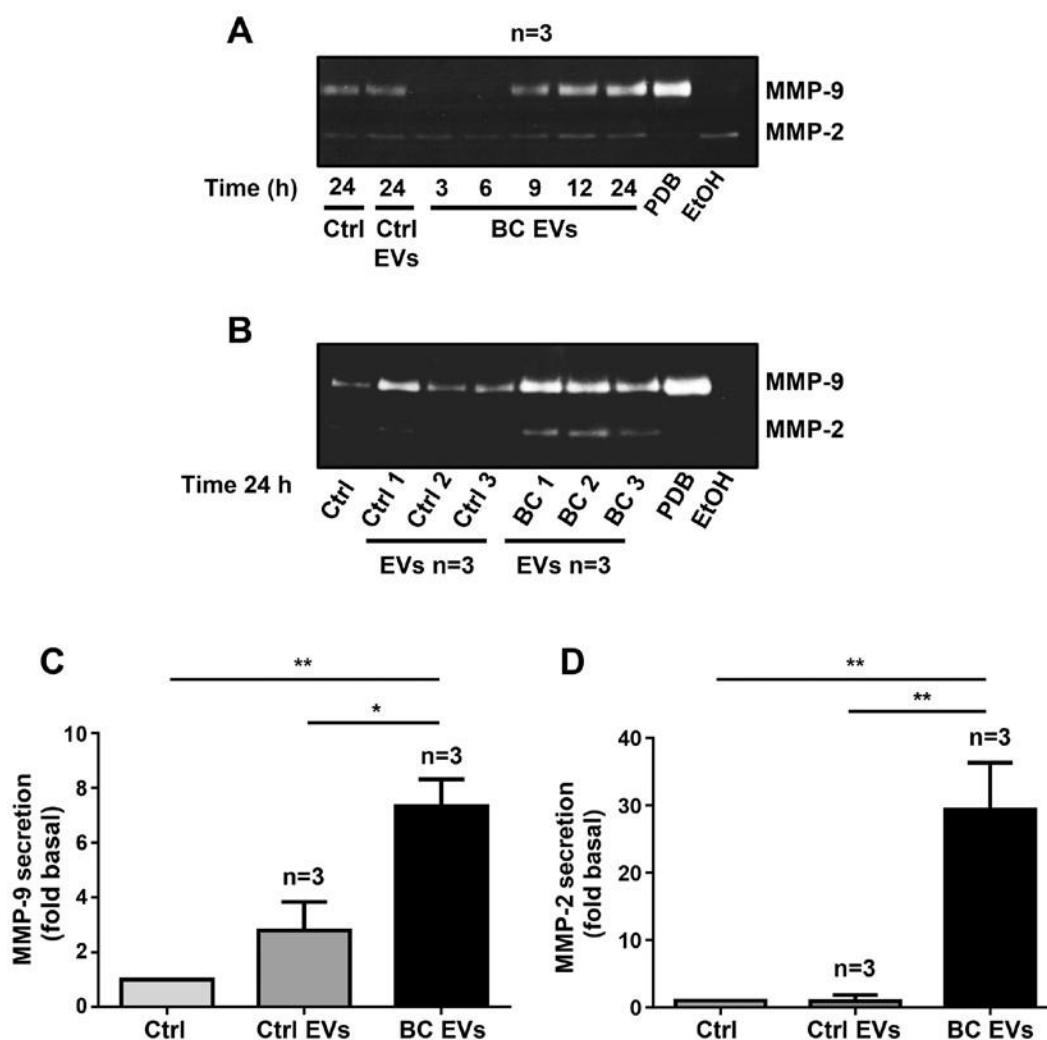


Figure 4. EVs isolated from patients with breast cancer mediate secretion of gelatinases. (A) MDA-MB-231 cells were incubated for various times with EVs from three healthy women and EVs from three patients with breast cancer, and conditioned media were collected. (B) MDA-MB-231 cells were incubated for 24 h with EVs from three healthy women and three patients with breast cancer. Gelatinase secretion was analyzed by gelatin-substrate gels, and positive controls of MMP-2 (EtOH) and MMP-9 (PDB) secretions were included. (C and D) Densitometric analysis of MMP-9 and MMP-2 secretion. Data are presented as the mean \pm SD, and are expressed as fold of MMP-2 or MMP-9 secretion above Ctrl and Ctrl EVs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as indicated. Ctrl, control; EVs, extracellular vesicles; Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women; BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer; MMP, matrix metalloproteinase; EtOH, ethanol; PBD, phorbol-12,13-dibutyrate.

Since treatment of MDA-MB-231 cells with BC EVs for 24 h induced MMP-2 and MMP-9 secretion, MDA-MB-231 cells were treated for 24 h with EVs from three patients with breast cancer and EVs from three healthy women, and supernatants were analyzed by gelatin zymography. The results indicated that treatment of MDA-MB-231 cells with Ctrl EVs induced a small increase in MMP-9 secretion, but stimulation with BC EVs induced a significant increase in both MMP-9 and MMP-2 secretion (Fig. 4B-D).

EVs from patients with breast cancer induce Src activation. In order to determine whether treatment of MDA-MB-231 cells with BC EVs induced Src activation, which is initiated by its phosphorylation at Tyr-418 (p-Src), MDA-MB-231 cells were treated for 20 min with three Ctrl EV samples and three BC EV samples, and cell lysates were analyzed by western blotting with anti-p-Src Ab. It was identified that treatment of MDA-MB-231 cells with Ctrl EVs induced a small level of phosphorylation of Src at Tyr-418, while treatment with BC EVs induced a strong phosphorylation of Src at Tyr-418 (Fig. 5A).

Next, whether Ctrl EVs and BC EVs contain p-Src and Src kinase was determined by western blotting with p-Src Ab and Src Ab. The results showed that Ctrl EVs contained a low amount of p-Src, while BC EVs contained a significantly larger amount of p-Src (Fig. 5B). However, it was demonstrated that Ctrl EVs and BC EVs contained a similar amount of Src kinase (Fig. 5B).

EVs from patients with breast cancer induce FAK activation via Src activity. The present study determined whether BC EVs induced FAK activation, which is induced by its phosphorylation at Tyr-397 (p-FAK). Lysates of MDA-MB-231 cells treated for 20 min with three Ctrl EV samples and three BC EV samples were analyzed by western blotting with anti-p-FAK Ab. It was identified that treatment with Ctrl EVs induced low levels of phosphorylation of FAK at Tyr-397, whereas treatment with BC EVs induced a significantly higher level of phosphorylation of FAK at Tyr-397 (Fig. 6A).

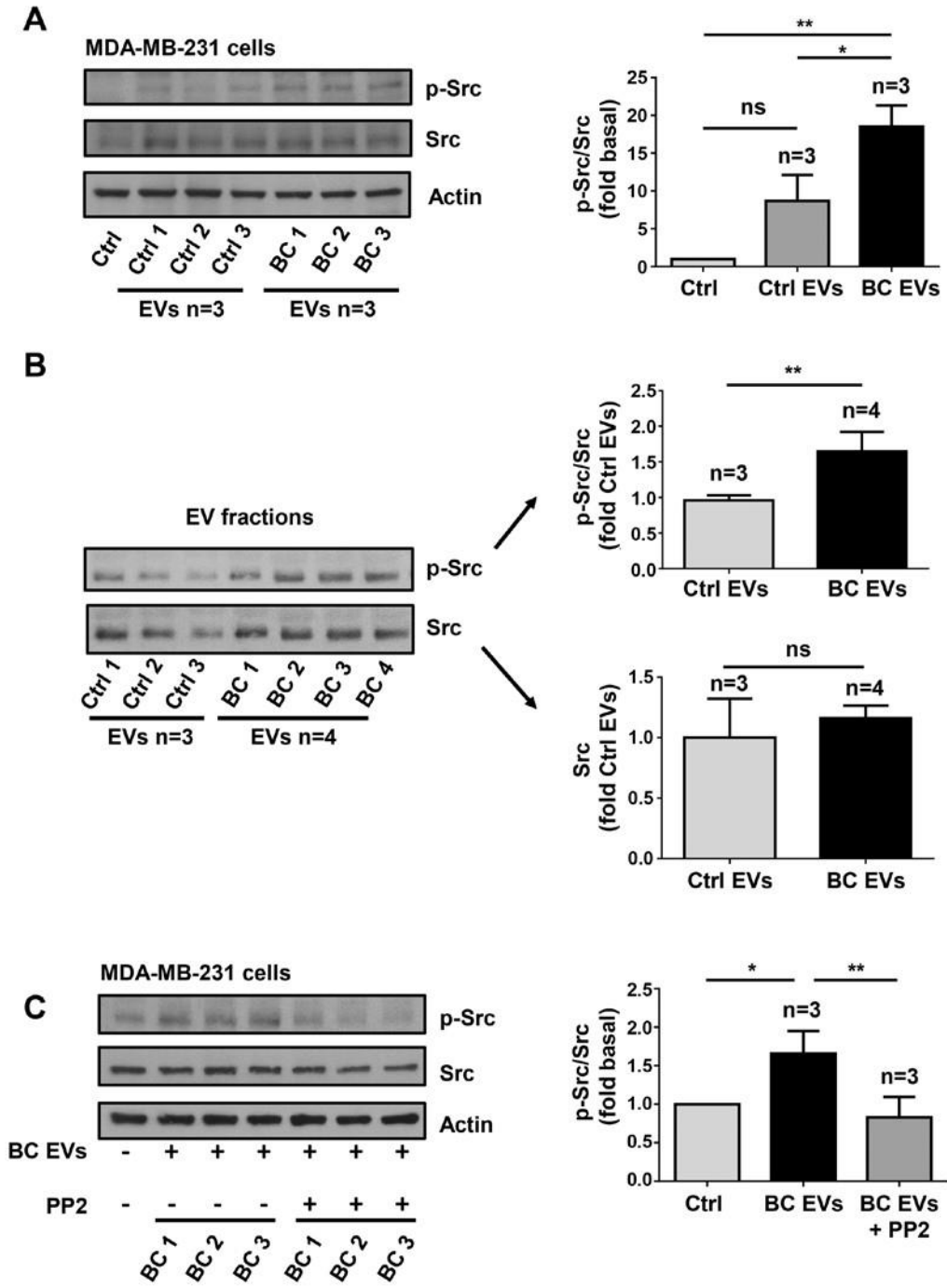


Figure 5. EVs isolated from patients with breast cancer induce Src activation. (A) Lysates from MDA-MB-231 cells treated for 20 min with three Ctrl EVs and three BC EVs were analyzed by western blotting with anti-p-Src Ab. Membranes were further analyzed with anti-Src Ab and anti-actin Ab as loading controls. (B) Three Ctrl EVs and four BC EVs were analyzed by western blotting with anti-p-Src Ab and anti-Src Ab. (C) Lysates from MDA-MB-231 cells untreated and treated for 1 h with 10 μ M PP2 and stimulated for 20 min with three BC EVs were analyzed by western blotting with anti-p-Src Ab. Membranes were further analyzed with anti-Src Ab and anti-actin Ab as loading controls. Data are presented as the mean \pm SD, and indicate the fold of p-Src or Src above Ctrl or Ctrl EVs. * P <0.05, ** P <0.01 vs. Ctrl and Ctrl EVs. ns, not significant; Ctrl, control; Ab, antibody; EVs, extracellular vesicles; Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women; BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer; p-, phosphorylated.

Since Src is able to induce maximal FAK activation mediated by G-protein-coupled receptors (GPCRs) and tyrosine kinase receptors (27), the role of Src in FAK activation was investigated. The role of Src was examined using PP2, which is a specific inhibitor of Src family members (39). To determine whether PP2 inhibited the activity of Src, MDA-MB-231 cells were untreated and treated for 1 h with 10 μ M PP2 and then treated for 20 min

with three BC EVs, and lysed. Cell lysates were analyzed by western blotting with anti-p-Src Ab, and it was found that PP2 inhibited the increase of p-Src induced by BC EVs (Fig. 5C). Next, MDA-MB-231 cells were untreated and treated for 1 h with 10 μ M PP2 and stimulated for 20 min with BC EVs. It was identified that treatment with BC EVs induced an increase of p-FAK via a Src-dependent pathway in MDA-MB-231 cells (Fig. 6B).

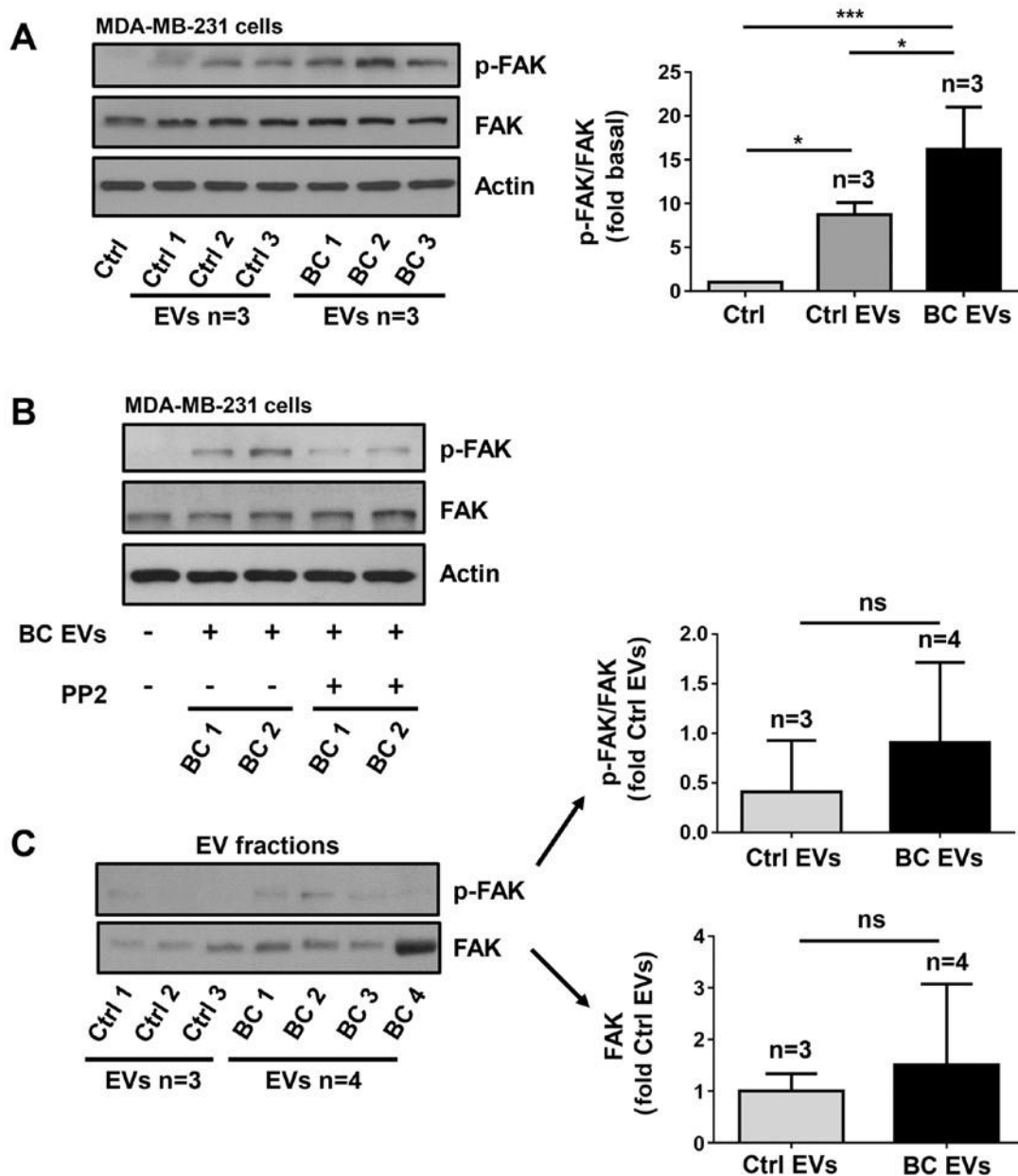


Figure 6. EVs isolated from patients with breast cancer induce FAK activation via a Src-dependent pathway. (A) Lysates from MDA-MB-231 cells treated for 20 min with three Ctrl EVs and three BC EVs were analyzed by western blotting with anti-p-FAK Ab. Membranes were further analyzed by western blotting with anti-FAK Ab and anti-actin Ab as loading controls. (B) MDA-MB-231 cells were untreated and treated for 1 h with 10 μ M PP2 and stimulated for 20 min with two BC EVs and lysed. Cell lysates were analyzed by western blotting with anti-p-FAK Ab. Membranes were analyzed further with anti-FAK Ab and anti-actin Ab as loading controls. (C) Three Ctrl EVs and four BC EVs were analyzed by western blotting with anti-p-FAK Ab and anti-FAK Ab. Data are presented as the mean \pm SD, and indicate the fold of p-FAK or FAK above Ctrl and Ctrl EVs. *P<0.05, ***P<0.001 vs. Ctrl and Ctrl EVs. ns, not significant; Ctrl, control; Ab, antibody; EVs, extracellular vesicles; Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women; BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer; p-, phosphorylated; FAK, focal adhesion kinase.

The present study also assessed whether p-FAK and FAK were localized in EV fractions, and three Ctrl EVs and four BC EVs were analyzed by western blotting with p-FAK Ab and FAK Ab. The results showed that Ctrl EVs and BC EVs expressed variable levels of p-FAK and FAK, and there was no significant difference in p-FAK and FAK expression levels between Ctrl EVs and BC EVs (Fig. 6C)

EVs from patients with breast cancer induce redistribution of p-FAK and focal adhesions assembly. It was examined whether BC EVs induced a redistribution of p-FAK, as well as the assembly of focal adhesions and the role of Src in the assembly of focal adhesions. MDA-MB-231 cells cultured on coverslips were untreated or treated for 1 h with 10 μ M PP2 and stimulated with Ctrl EVs and BC EVs. The redistribution of p-FAK was analyzed by immunofluorescence with anti-p-FAK Ab. Moreover, the number of focal adhesions was analyzed by immunofluorescence with anti-vinculin Ab, as vinculin is a cytoplasmic actin binding protein enriched in focal adhesions (40). It was demonstrated that BC EVs induced the redistribution of p-FAK at the edges of cells, and increased the number of focal adhesions (Fig. 7A and B). Furthermore, focal adhesion assembly induced by BC EVs was dependent on Src activity (Fig. 7B). In addition, the present study determined whether vinculin was localized in EV fractions, and three Ctrl EVs and four BC EVs were analyzed by western blotting with anti-vinculin Ab; the results indicated that Ctrl EVs and BC EVs did not express vinculin (Fig. 7C). One control of vinculin expression was included (Fig. 7D).

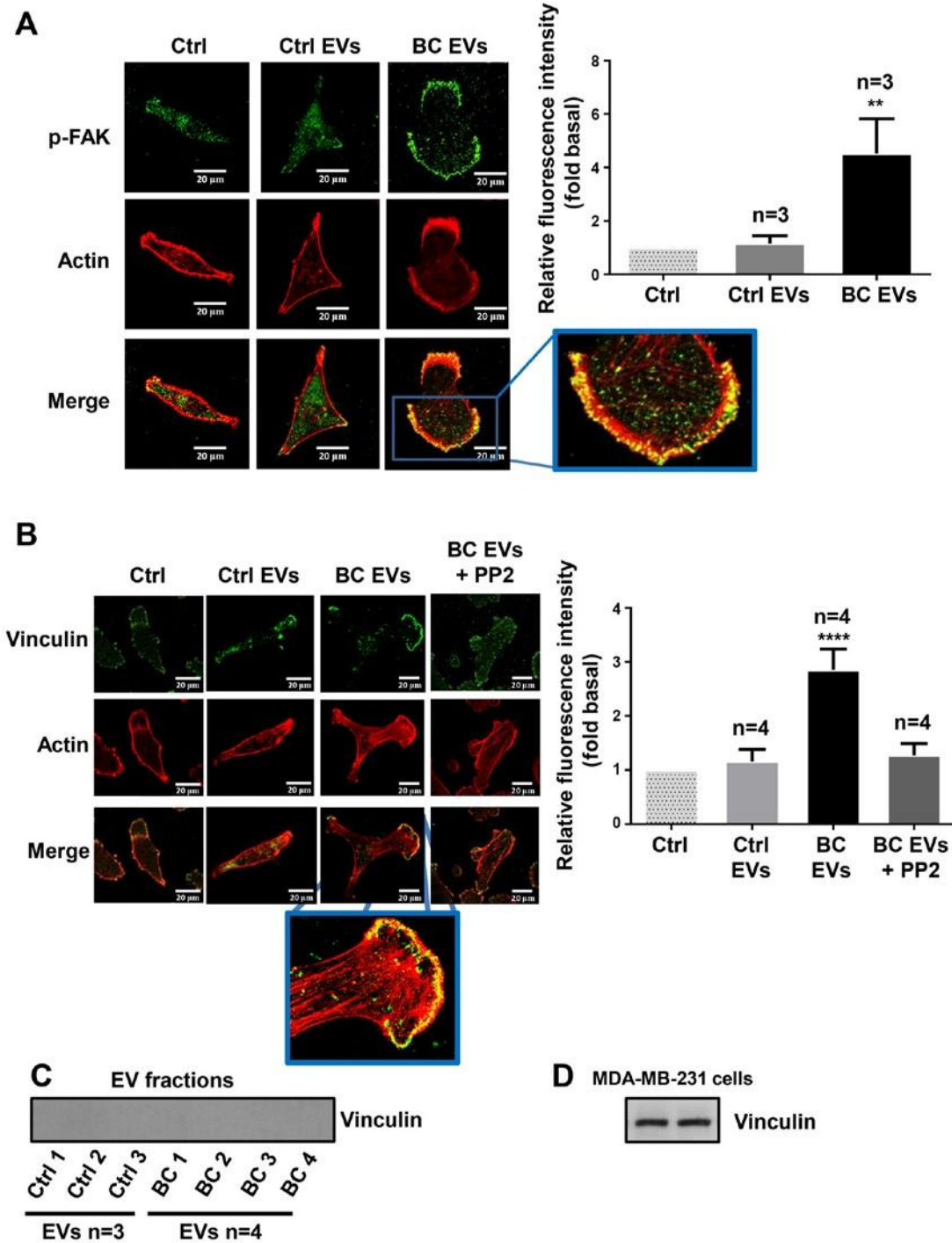


Figure 7. EVs from patients with breast cancer induce redistribution of p-FAK and focal adhesions assembly. (A and B) MDA-MB-231 cells cultured on coverslips were treated for 1 h with or without 10 μ M of PP2, and stimulated for 30 min with Ctrl EVs and BC EVs. Cells were incubated with Abs against p-FAK, vinculin and tetramethylrhodamine-conjugated phalloidin, and were analyzed by confocal microscopy. (C) Analysis of vinculin in Ctrl EVs and BC EVs by western blotting. (D) Whole cell lysates of MDA-MB-231 cell were included as a control of vinculin expression. Data are presented as the mean \pm SD of fluorescent intensities of p-FAK and vinculin, and are expressed as fold above Ctrl. ** P <0.01, **** P <0.0001 vs. Ctrl. ns, not significant; Ctrl, control; Ab, antibody; EVs, extracellular vesicles;

Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women; BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer; p-, phosphorylated; FAK, focal adhesion kinase.

Role of Src in migration and invasion mediated by EVs from patients with breast cancer. The role of Src in migration was examined using PP2 and its inactive analog (PP3) (39). Cultures of MDA-MB-231 cells were treated for 1 h with 10 μ M PP2 or 10 μ M PP3, scratch-wounded and stimulated with Ctrl EVs and BC EVs. It was demonstrated that migration induced by BC EVs was dependent on Src activity in MDA-MB-231 cells (Fig. 8A).

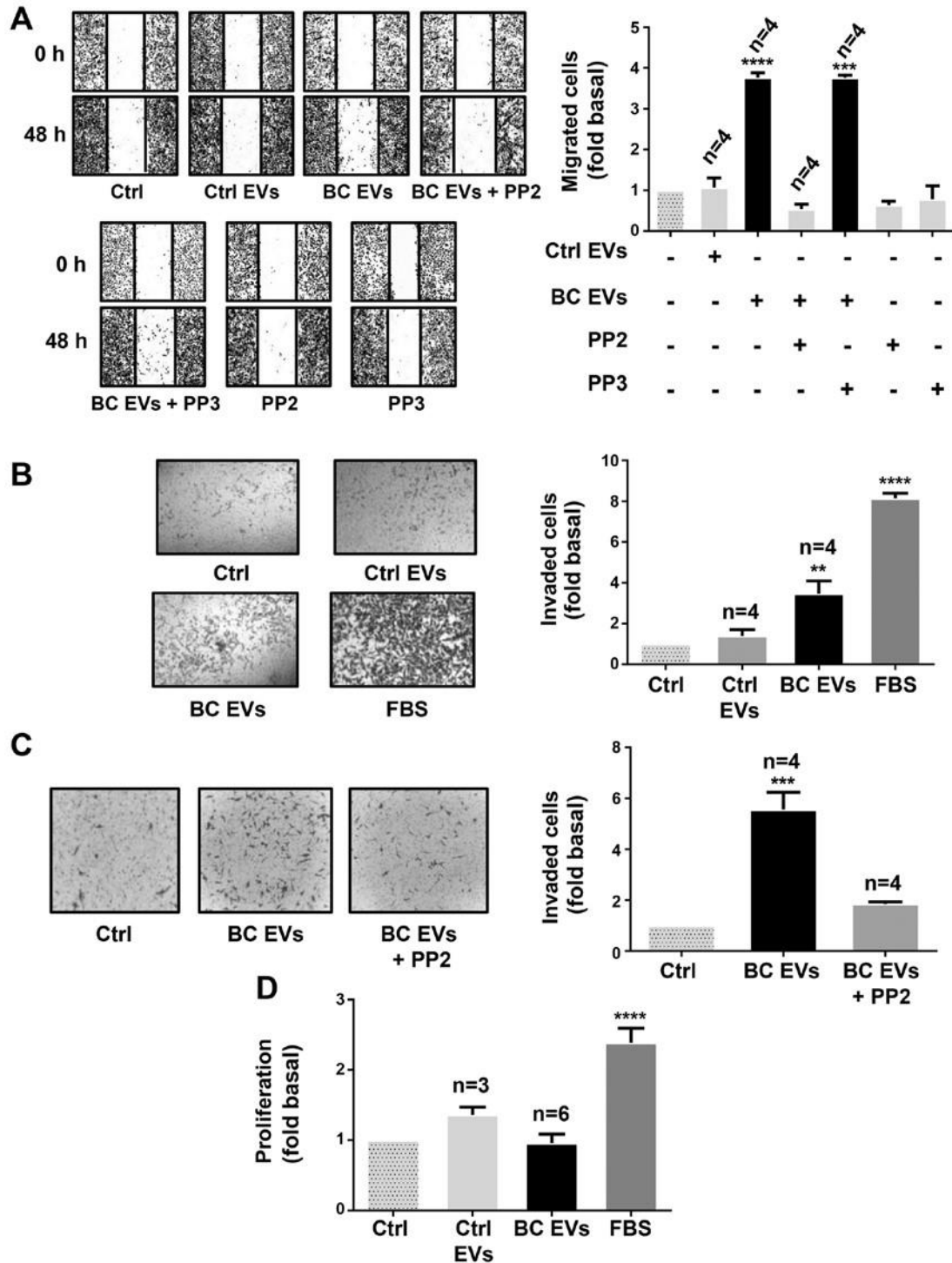


Figure 8. EVs from patients with breast cancer induce migration and invasion via a Src-dependent pathway. (A) Migration assays of MDA-MB-231 cells treated for 1 h with or without 10 μ M PP2 or 10 μ M PP3, and stimulated for 48 h with Ctrl EVs and BC EVs. Magnification, x100. (B and C) Invasion assays of MDA-MB-231 cells treated with or without 10 μ M PP2 and stimulated for 48 h with Ctrl EVs and BC EVs. Magnification, x400. (D) Proliferation assay of MDA-MB-231 cells incubated with Ctrl EVs and BC EVs. FBS was included as the control. Data are presented as the mean \pm SD, and are expressed as fold of migration, invasion or proliferation above Ctrl. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs. Ctrl. Ctrl, control; EVs, extracellular vesicles; Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women; BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer.

Next, it was studied whether BC EVs induced invasion, and the role of Src was assessed using invasion assays with MDA-MB-231 cells treated with Ctrl EVs and BC EVs. It was identified that BC EVs induced invasion of MDA-MB-231 cells (Fig. 8B). Moreover, invasion assays performed in the presence of PP2 demonstrated that invasion required Src activity (Fig. 8C).

In addition, whether BC EVs induce proliferation in MDA-MB-231 cells was examined, and proliferation assay results found that BC EVs and Ctrl EVs did not induce proliferation in MDA-MB-231 cells (Fig. 8D).

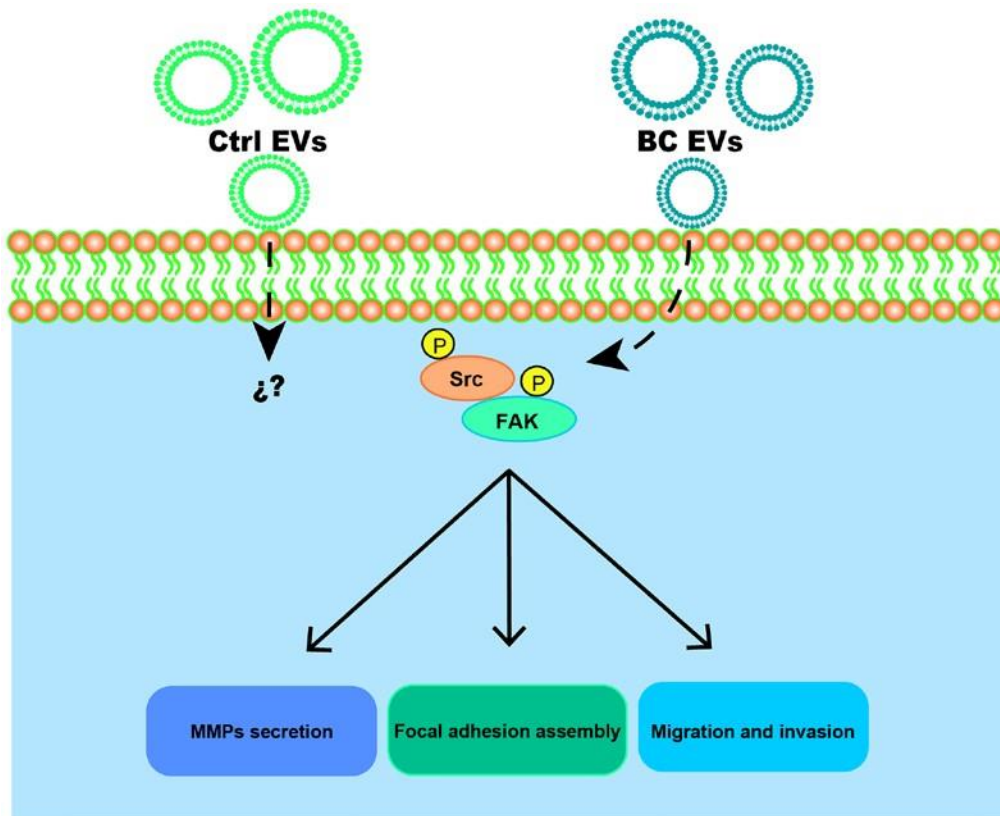


Figure 9. Proposed roles of EVs obtained from patients with breast cancer in the migration and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells. EVs, extracellular vesicles; Ctrl EVs, EV fractions obtained from healthy women; BC EVs, EV fractions obtained from women with breast cancer; p, phosphorylated; FAK, focal adhesion kinase; MMP, matrix metalloproteinase.

Discussion

EVs are comprised of exosomes and microvesicles, which constitute a variety of vesicles between 30 - 1,000 nm (7). The present study isolated EVs from plasma samples as described previously by Baran *et al* (17), as this method was reported to isolate EVs via the depletion of EVs from platelets. In plasma, EVs from platelets constitute ~80% of total EVs (17,41). The present results demonstrated that isolated EV fractions are comprised of vesicles with sizes between 30-300 nm in healthy women,

while women with breast cancer showed EVs from 50-600 nm. Furthermore, both Ctrl EVs and BC EVs expressed molecular markers associated with EVs. Therefore, it was speculated that isolated EV fractions from plasma samples corresponded to exosomes and microvesicles, which are not contaminated with cell debris and apoptotic bodies, and were free of platelet-derived EVs. Therefore, it was proposed that cell processes studied may be mediated by exosomes and/or microvesicles. The contribution of microvesicles and exosomes to the cell processes analyzed remains to be investigated. Moreover, the present results demonstrated that the number of EVs in plasma is higher in women with breast cancer than in healthy women; however, the number of EVs in the present study were found to be higher than the number of EVs reported in a previous study (18). A different number of EVs was found in the present study because the number of EVs was determined using NTA, while in the previous study the number of EVs was determined by flow cytometry. NTA has a higher sensitivity for determining the number of EVs than flow cytometry. However, both studies demonstrated that the number of EVs is higher in women with breast cancer than in healthy women.

Cancer metastasis consists of several sequential steps, including detachment of cells, migration, invasion to surrounding tissues, intravasation, survival in circulation, extravasation and colonization. Moreover, invasion of cancer cells to other tissues involves cell migration as single cells (mesenchymal type) or epithelial sheets (42). EVs are implicated in intercellular communication in the tumor microenvironment, as they mediate crosstalk between cancer and stromal cells (43). In addition, EVs support cancer development, adaptation to hypoxic conditions, deprivation of nutrients, escape of apoptosis, immune evasion and cancer progression (43-45). Furthermore, exosomes released from cancer-associated fibroblasts (CAFs) induce the formation of protrusions and motility in MDA-MB-231 cells, while mesenchymal stem cells secrete exosomes that promote motility and invasiveness in breast cancer cells (46,47). It has been shown that Hs578T cells and their more invasive variant Hs578T(i)₈ secrete EVs that promote proliferation, migration and invasion in breast cancer cells (48). The present results showed that EVs from women with breast cancer stages II and III induced cell migration and this was dependent on Src activity in MDA-MB-231 cells. However, EVs from healthy women did not induce migration in MDA-MB-231 cells. Moreover, migration induced by EVs from patients with breast cancer was independent of the expression levels of estrogen, progesterone and Her-2/neu receptors in the tumors of patients. In contrast, it was identified that BC EVs did not induce migration in MCF-7 cells, and did not induce migration and invasion in MCF12A mammary epithelial cells. However, in contrast to the present results, it has been previously reported that exosomes from healthy women stimulate migration and invasion in MDA-MB-231 cells (49). Thus, it was speculated that BC EVs consist of subpopulations of exosomes and microvesicles secreted from cancer cells (tumor) and stromal cells, such as tumor-associated macrophages, mesenchymal stem cells and CAFs. Therefore, BC EVs have a larger capacity for the induction of cell migration and invasion compared with Ctrl EVs in MDA-MB-231 cells. Thus, this may be the reason for the lack of the migration and invasion mediated by stimulation with EVs from healthy women.

Furthermore, it was speculated that only BC EVs contain molecules that induce the activation of specific signal transduction pathways, including Src activation, which mediate a variety of cell processes, including migration in breast cancer cells. It was identified that BC EVs do not induce migration and/or invasion in MCF12A mammary epithelial cells and MCF-7 breast cancer cells, which express progesterone and estrogen receptors. Furthermore, the present results suggested that EVs from women with breast cancer stages II and III can induce migration in breast cancer cells that

do not express these receptors, and that this was a specific process in TNBC cells. Moreover, it was speculated that EVs in patients with breast cancer play an important role in cancer progression, as they are able to induce migration and invasion. In line with the present results, it has been reported that treatment of HMLE human mammary epithelial cells with exosomes from MDA-MB-231 cells transfected with microRNA-1246 increases its ability for drug resistance, growth and invasion (50). In addition, K562 myeloid leukemia cells release exosomes that promote angiogenesis via Src activation, while exosomes from C4-2B, PC3 and DU145 prostate cancer cells contain Src, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor and FAK, which are molecules involved in cell migration and invasion (51,52).

Tumor cells communicate with surrounding cells, including CAFs, endothelial cells and mesenchymal cells, via the secretion and uptake of EVs, which mediate biological processes, such as migration, angiogenesis and invasion, and can also modulate the tumor microenvironment and metastasis (34,43,53). The present results indicated that MDA-MB-231 cells are able to take up BC EVs and Ctrl EVs, however only BC EVs induce migration. Thus, BC EVs may have cargo molecules that promote activation of specific signal transduction pathways, which increases migration and invasion in breast cancer cells.

EVs express PS on their membrane surface, which mediates the fusion of EVs with target cells. Therefore, treatment of EVs with Annexin V inhibits the fusion of EVs with target cells, as Annexin V binds to PS (43,54,55). In the present study, it was identified that treatment of Ctrl EVs with Annexin V inhibited the increase of fluorescence intensity mediated by Ctrl EVs. However, treatment of BC EVs with Annexin V did not inhibit the increased fluorescence intensity mediated by BC EVs. Thus, it was speculated that BC EVs do not express, or express very low levels, of PS on their membrane surface. It has been reported that EV fractions obtained from females with type I diabetes and controls without disease contain both EVs expressing PS and EVs without expression of PS (56), which is consistent with the present results. Moreover, the percentage of PS in EVs from patients is 31%, while the percentage of PS in controls without disease is 44% (56).

Src family kinases mediate a variety of cellular processes, such as cell cycle progression, proliferation, survival and migration (57). Furthermore, it has been reported that breast cancer tumors and cell lines have an increase in Src activity (58). In addition, linoleic acid induces FAK and Src activation, and cell migration via a Src-dependent pathway in MDA-MB-231 cells (28). The present results demonstrated that stimulation with BC EVs induced a stronger activation of FAK and Src compared with treatment with Ctrl EVs, and also increased the number of focal adhesions in MDA-MB-231 cells. As FAK and Src activation and focal adhesion assembly mediate migration and invasion, it was speculated that BC EVs induced the activation of signal transduction pathways, including the activation of FAK and Src, which mediated migration and invasion in MDA-MB-231 cells. In line with the present results, mouse embryonic fibroblasts expressing onco-Dbl release microvesicles containing FAK and stimulation of fibroblasts with these vesicles promotes proliferation, which is independent of anchorage and survival in fibroblasts (59).

A variety of phosphoproteins, including Src, have been revealed in EVs from human plasma (60). Moreover, EVs from plasma of women with breast cancer contain FAK and EGFR kinases, and the level of these kinases are increased in specific stages of breast cancer in comparison with the control group (18). Furthermore, the present results indicated that Ctrl EVs and BC EVs contained similar expression levels of p-FAK, FAK and Src, but BC EVs contained larger amounts of p-Src compared

with Ctrl EVs. Thus, it was demonstrated, that BC EVs induced FAK and Src activation; however, the contribution of p-FAK, FAK, p-Src and Src expressed in EVs to the activation of these kinases in the target MDA-MB-231 cells requires further investigation.

A catalytic reciprocal activation model of FAK and Src has been previously reported, where Src associates with FAK and phosphorylates FAK at Tyr-576 and Tyr-577, which induces maximal kinase activity of FAK (32,61,62). In addition, it has been revealed that maximal kinase activity of FAK promotes intermolecular phosphorylation between FAK molecules at Tyr-397, which induces signal amplification (32,61,62). In line with this model, the present results demonstrated that BC EVs induced activation of FAK, which was dependent on Src kinase activity. Linoleic acid, oleic acid and arachidonic acid induce activation of FAK via GPCRs and a mechanism of reciprocal catalytic activation of FAK (28,63-65). Therefore, it was speculated that EVs mediated activation of FAK and Src, as well as migration and invasion via activation of receptors.

Tumors release EVs that play a pivotal role in the invasion and metastasis processes, EVs from patients with breast cancer are associated with metastasis and relapse (14,43). In the present study, it was identified that EVs from patients with breast cancer induced migration and invasion via Src activity in MDA-MB-231 cells. Moreover, in line with the present results, it has been shown that exosomes from patients with TNBC induce invasion in SKBR3 cells (48). In addition, it was found that treatment of non-tumorigenic mammary epithelial cells MCF12A with BC EVs does not induce migration. It is proposed that BC EVs may mediate progression processes in breast cancer via the transfer of molecules and activation of signal transduction pathways. Supporting this hypothesis, different tumors release EVs with a variety of integrin expression patterns, which are able to determine organ specific metastasis (14,66). Moreover, EVs expressing $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 6\beta 1$ integrins are associated with lung metastasis, while EVs expressing $\alpha v\beta 5$ are associated with liver metastasis (14,66).

ECM degradation is required for tumor growth and metastasis (67). In addition, EVs contain proteases that mediate degradation of ECM (68,69). It has been reported that human fibrosarcoma cells HT1080 release EVs expressing gelatinases in an active form, while breast cancer cells 8701-BC secrete EVs containing MMP-9 (68,69). The present results demonstrated that BC EVs induced an increase in MMP-9 and MMP-2 secretion in MDA-MB-231 cells. Therefore, EVs may participate in the progression of breast cancer.

In conclusion, it was demonstrated that BC EVs promoted migration, invasion and MMP-2 and MMP-9 secretion in MDA-MB-231 cells (Fig. 9). Moreover, BC EVs enhanced migration and invasion via a Src-dependent pathway. Therefore, the present results suggested that EVs may participate in breast cancer progression.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Nora Ruiz and Ms. María de Lourdes-Rojas (LaNSE, Cinvestav-IPN) for their technical assistance.

Funding

The research was funded by CONACYT (grant no. 255429) and CONACYT-FOSISS (grant no. 261637), Mexico. Grants from CONACYT supported the present study.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

JRR performed the majority of experiments. EPS, JRR and RTB drafted the paper. ELO and PCR helped with experiments and reviewed/edited the manuscript. EPS, RTB, EMB, COM, FBM, AHT and IEA analyzed and validated data, and reviewed part of the manuscript. EPS and RTB coordinated the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All studied participants provided signed informed consent, and the protocol was approved by the ethics committee of the First October Regional Hospital - ISSSTE (approval no. 121.2016), and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Samavat H and Kurzer MS: Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett* 356 (2 Pt A): 231-243, 2015.
2. Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67: 7-30, 2017.
3. Ruiz R, Herrero C, Strasser-Weippl K, Touya D, St Louis J, Bukowski A and Goss PE: Epidemiology and pathophysiology of pregnancy-associated breast cancer: A review. *Breast* 35: 136-141, 2017.
4. Nishimura R and Arima N: Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? *Breast Cancer* 15: 303-308, 2008.
5. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslén LA, *et al*: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752, 2000.

6. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, *et al*: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10869-10874, 2001.
7. Raposo G and Stoorvogel W: Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200: 373-383, 2013.
8. Théry C, Zitvogel L and Amigorena S: Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2: 569-579, 2002.
9. Skotland T, Sandvig K and Llorente A: Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res* 66: 30-41, 2017.
10. Kelleher RJ Jr, Balu-Iyer S, Loyall J, Sacca AJ, Shenoy GN, Peng P, Iyer V, Fathallah AM, Berenson CS, Wallace PK, *et al*: Extracellular vesicles present in human ovarian tumor microenvironments induce a phosphatidylserine-dependent arrest in the T-cell signaling cascade. *Cancer Immunol Res* 3: 1269-1278, 2015.
11. Lima LG, Chammas R, Monteiro RQ, Moreira ME and Barcinski MA: Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett* 283: 168-175, 2009.
12. Lea J, Sharma R, Yang F, Zhu H, Ward ES and Schroit AJ: Detection of phosphatidylserine-positive exosomes as a diagnostic marker for ovarian malignancies: A proof of concept study. *Oncotarget* 8: 14395-14407, 2017.
13. Sharma R, Huang X, Brekken RA and Schroit AJ: Detection of phosphatidylserine-positive exosomes for the diagnosis of early-stage malignancies. *Br J Cancer* 117: 545-552, 2017.
14. Kanada M, Bachmann MH and Contag CH: Signaling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks. *Trends Cancer* 2: 84-94, 2016.
15. Dourado MR, Korvala J, Åström P, De Oliveira CE, Cervigne NK, Mofatto LS, Campanella Bastos D, Pereira Messetti AC, Graner E, Paes Leme AF, *et al*: Extracellular vesicles derived from cancer-associated fibroblasts induce the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Extracell Vesicles* 8: 1578525, 2019.
16. Au Yeung CL, Co NN, Tsuruga T, Yeung TL, Kwan SY, Leung CS, Li Y, Lu ES, Kwan K, Wong KK, *et al*: Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun* 7: 11150, 2016.
17. Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, Szatanek R, Zembala M, Barbasz J, Czupryna A, Szczepanik A and Zembala M: Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 59: 841-850, 2010.
18. Galindo-Hernandez O, Villegas-Comonfort S, Candanedo F, González-Vázquez MC, Chavez-Ocaña S, Jimenez-Villanueva X, Sierra-Martinez M and Salazar EP: Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients. *Arch Med Res* 44: 208-214, 2013.
19. Zhao Z, Fan J, Hsu YS, Lyon CJ, Ning B and Hu TY: Extracellular vesicles as cancer liquid biopsies: From discovery, validation, to clinical application. *Lab Chip* 19: 1114-1140, 2019.
20. Egeblad M and Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174, 2002.
21. Sternlicht MD and Werb Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516, 2001.
22. Coussens LM, Fingleton B and Matrisian LM: Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* 295: 2387-2392, 2002.
23. McCawley LJ and Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: Multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6: 149-156, 2000.
24. DeMali KA, Wennerberg K and Burridge K: Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 15: 572-582, 2003.
25. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L and Keely PJ: Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 1692: 103-119, 2004.

26. Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM and Weed SA: Focal adhesion kinase: A regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19: 5606-5613, 2000.
27. Schlaepfer DD, Hauck CR and Sieg DJ: Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 71: 435-478, 1999.
28. Serna-Marquez N, Villegas-Comonfort S, Galindo-Hernandez O, Navarro-Tito N, Millan A and Salazar EP: 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 (Dordr)* 36: 65-77, 2013.
29. Schaller MD: Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1540: 1-21, 2001.
30. Zhao J and Guan JL: Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28: 35-49, 2009.
31. Parsons JT: Focal adhesion kinase: The first ten years. *J Cell Sci* 116: 1409-1416, 2003.
32. Schaller MD, Hildebrand JD and Parsons JT: Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol Biol Cell* 10: 3489-3505, 1999.
33. Thery C, Amigorena S, Raposo G and Clayton A: Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 30: 3.22.1-3.22.29, 2006.
34. Galindo-Hernandez O, Gonzales-Vazquez C, Cortes-Reynosa P, Reyes-Urbe E, Chavez-Ocaña S, Reyes-Hernandez O, Sierra-Martinez M and Salazar EP: Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol* 36: 9649-9659, 2015.
35. Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hirata N, Kitahara S, Maishi N, Osawa T, Yamamoto K, Kondoh M, Shindoh M, *et al*: Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis. *PLoS One* 7: e34045, 2012.
36. Ke Z, Lin H, Fan Z, Cai TQ, Kaplan RA, Ma C, Bower KA, Shi X and Luo J: MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. *Int J Cancer* 119: 8-16, 2006.
37. Park MJ, Park IC, Hur JH, Rhee CH, Choe TB, Yi DH, Hong SI and Lee SH: Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Lett* 290: 201-204, 2000.
38. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A and D'Souza-Schorey C: Microvesicles: Mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 123: 1603-1611, 2010.
39. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA and Connelly PA: Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271: 695-701, 1996.
40. Bays JL and DeMali KA: Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell Mol Life Sci* 74: 2999-3009, 2017.
41. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW and Radder JK: Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106: 2442-2447, 2002.
42. Gupta GP and Massagué J: Cancer metastasis: Building a framework. *Cell* 127: 679-695, 2006.
43. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H and Lyden D: Extracellular vesicles in cancer: Cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell* 30: 836-848, 2016.
44. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, *et al*: Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4: 27066, 2015.
45. Maas SLN, Breakefield XO and Weaver AM: Extracellular vesicles: Unique intercellular delivery vehicles. *Trends Cell Biol* 27: 172-188, 2017.

46. Lin R, Wang S and Zhao RC: Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Mol Cell Biochem* 383: 13-20, 2013.
47. Luga V and Wrana JL: Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res* 73: 6843-6847, 2013.
48. O'Brien K, Rani S, Corcoran C, Wallace R, Hughes L, Friel AM, McDonnell S, Crown J, Radomski MW and O'Driscoll L: Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. *Eur J Cancer* 49: 1845-1859, 2013.
49. Shtam T, Naryzhny S, Samsonov R, Karasik D, Mizgirev I, Kopylov A, Petrenko E, Zabrodskaya Y, Kamyshinsky R, Nikitin D, *et al*: Plasma exosomes stimulate breast cancer metastasis through surface interactions and activation of FAK signaling. *Breast Cancer Res Treat* 174: 129-141, 2019.
50. Li XJ, Ren ZJ, Tang JH and Yu Q: Exosomal microRNA miR-1246 promotes cell proliferation, invasion and drug resistance by targeting CCNG2 in breast cancer. *Cell Physiol Biochem* 44: 1741-1748, 2017.
51. DeRita RM, Zerlanko B, Singh A, Lu H, Iozzo RV, Benovic JL and Languino LR: c-Src, insulin-like growth factor I receptor, G-protein-coupled receptor kinases and focal adhesion kinase are enriched into prostate cancer cell exosomes. *J Cell Biochem* 118: 66-73, 2017.
52. Mineo M, Garfield SH, Taverna S, Flugy A, De Leo G, Alessandro R and Kohn EC: Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis* 15: 33-45, 2012.
53. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y and Ochiya T: How cancer cells dictate their microenvironment: Present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 74: 697-713, 2017.
54. Meckes DG Jr, Shair KH, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH and Raab-Traub N: Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 20370-20375, 2010.
55. Keller S, König AK, Marmé F, Runz S, Wolterink S, Koengen D, Mustea A, Sehouli J and Altevogt P: Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett* 278: 73-81, 2009.
56. Bergen K, Mobarrez F, Jörneskog G, Wallén H and Tehrani S: Phosphatidylserine expressing microvesicles in relation to microvascular complications in type 1 diabetes. *Thromb Res* 172: 158-164, 2018.
57. Parsons JT and Parsons SJ: Src family protein tyrosine kinases: Cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 187-192, 1997.
58. Egan C, Pang A, Durda D, Cheng HC, Wang JH and Fujita DJ: Activation of Src in human breast tumor cell lines: Elevated levels of phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530. *Oncogene* 18: 1227-1237, 1999.
59. Kreger BT, Dougherty AL, Greene KS, Cerione RA and Antonyak MA: Microvesicle cargo and function changes upon induction of cellular transformation. *J Biol Chem* 291: 19774-19785, 2016.
60. Chen IH, Xue L, Hsu CC, Paez JS, Pan L, Andaluz H, Wendt MK, Iliuk AB, Zhu JK and Tao WA: Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 3175-3180, 2017.
61. Owen JD, Ruest PJ, Fry DW and Hanks SK: Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol* 19: 4806-4818, 1999.
62. Salazar EP and Rozengurt E: Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *J Biol Chem* 276: 17788-17795, 2001.

63. Navarro-Tito N, Robledo T and Salazar EP: Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Exp Cell Res* 314: 3340-3355, 2008.
64. Navarro-Tito N, Soto-Guzman A, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R and Salazar EP: Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 306-317, 2010.
65. Soto-Guzman A, Robledo T, Lopez-Perez M and Salazar EP: 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, 2008.
66. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, *et al*: Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527: 329-335, 2015.
67. Hotary K, Li XY, Allen E, Stevens SL and Weiss SJ: A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* 20: 2673-2686, 2006.
68. Dolo V, Ginestra A, Cassarà D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR, Nagase H, Canevari S, Pavan A and Vittorelli ML: Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res* 58: 4468-4474, 1998.
69. Ginestra A, Monea S, Seghezzi G, Dolo V, Nagase H, Mignatti P and Vittorelli ML: Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* 272: 17216-17222, 1997.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License