

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.**

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

“Estudio de la participación de la insulina en un proceso similar a la transición epitelio-mesénquima en células no tumorales MCF10A y en procesos de migración/invasión en células cancerosas mamarias MDA-MB-231”.

Tesis que presenta:

**M. en C. Cecilia Yazmín Rodríguez Monterrosas**

Para obtener el grado de:

**Doctora en Ciencias**

En la especialidad:

**Biología Celular**

Director de la tesis:

**Dr. José Eduardo Pérez Salazar**

**Ciudad de México**

**Enero del 2018**

Este trabajo fue realizado 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 del Departamento de Biología Celular, siendo becaria CONACYT de Agosto 2012 a Julio 2016 con número de registro 243350.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. José Eduardo Pérez Salazar** por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por su apoyo durante el desarrollo de mis estudios de posgrado.

A mis sinodales: **Dra. Guadalupe Reyes Cruz**, **Dr. José de Jesús Serrano Luna**, **Dra. Emma S. Calderón Aranda** y **Dr. Napoleón Navarro Tito** por su asesoría, disponibilidad, paciencia y amabilidad en la revisión de esta tesis.

A **Nora Araceli Ruíz Durán**, técnico del laboratorio 42 del Departamento de Biología Celular; por su invaluable amistad, cariño y apoyo.

Al **Dr. Pedro Cortés Reynosa**, auxiliar del laboratorio 42 del Departamento de Biología Celular, por su constante asesoría y apoyo técnico.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 42: **Dra. Nathalia Serna**, **Dr. Roberto Espinosa**, **Dr. Emmanuel Reyes**, **Dr. Octavio Galindo**, **Dr. Sócrates Villegas**, **Dra. Rocío Castillo**, **Dra. Alejandra Ordoñez**, M. en C. **Ricardo Díaz**, M. en C. **Javier Ramírez**, M. en C. **Christian González**, M. en C. **Cleo Mendoza**, M. en C. **Elizabeth Leal**, M. en C. **Paola Hernández**, M. en C. **Nínive Rodríguez**, M. en C. **Mileidy Martínez** y M. en C. **Ander Txurruka**, por hacer que ésta etapa fuera amena y por su valiosa aportación al mejoramiento de este proyecto.

A las secretarias del Departamento de Biología Celular **Blanca Estela Olgún** y **Clara Hernández Chávez** por su asistencia secretarial durante mi estancia de posgrado.

## **DEDICATORIA**

A mis padres:

**Hermila Monterrosas González**

**Ciro Rodríguez Reyes**

Por ser mi fuente de inspiración y vida, por su apoyo incondicional  
y por haber creído en mí en todo momento.

A mis hermanos:

**Norma Leticia Rodríguez Monterrosas**

**César Miguel Rodríguez Monterrosas**

Por su inmenso amor, por guiarme y por ser grandes ejemplos de  
fortaleza.

A mis sobrinas:

**Dulce Estefanía Vivanco Rodríguez**

**Fátima Rodríguez Lezama**

**Aimara Rodríguez Colorado**

Porque con sus sonrisas me enseñaron lo grandioso de la vida.

# ÍNDICE

<b>I. ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>II. RESUMEN</b> .....	2
<b>III. ABSTRACT</b> .....	4
<b>IV. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
IV.1 Cáncer mamario.....	5
IV.2 Epidemiología del cáncer mamario.....	6
IV.3 Etiología del cáncer mamario.....	7
IV.3.1 Factores de riesgo genéticos.....	8
IV.3.2 Factores de riesgo reproductivos.....	9
IV.3.3 Factores de riesgo relacionados al estilo de vida.....	10
IV.3.3.1 Ácidos grasos y cáncer.....	12
IV.3.3.2 Hiperinsulinemia y cáncer.....	14
IV.4 Metástasis.....	16
IV.4.1 Transición epitelio-mesénquima (TEM).....	18
<b>V. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>VI. HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>VII. OBJETIVOS</b> .....	23
VII.1 Objetivo general.....	23
VII.2 Objetivos particulares.....	23
<b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
VIII.1 Material biológico.....	24
VIII.2 Reactivos.....	24
VIII.3 Cultivos celulares.....	26
VIII.4 Ensayos de estimulación con ácido linoleico e insulina...26	

VIII.5 Obtención de extractos totales.....	27
VIII.6 Western Blot.....	27
VIII.7 Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”.....	28
VIII.8 En sayo de migración en cámara de Boyden.....	28
VIII.9 Zimografía en gelatina.....	29
VIII.10 Ensayo de invasión.....	30
VIII.11 Ensayo de proliferación.....	31
VIII.12 Preparación de extractos nucleares para EMSA.....	32
VIII.13 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA).....	32
VIII.14 Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y PCR tiempo real (RT-qPCR).....	32
VIII.15 Microscopía confocal.....	33
VIII.16 Análisis estadístico.....	34
<b>IX. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
IX.1 El AL induce un incremento en la expresión de IR e IGF-1R en células cancerosas mamarias MDA-MB-231.....	35
IX. 2 El AL induce un incremento en la expresión de IR e IGF-1R a través de una vía dependiente de FFAR4.....	39
IX.3 El AL promueve un incremento en la migración celular inducida por la insulina en células MDA-MB-231.....	41
IX.4 El pretratamiento con AL incrementa la secreción de MMP-9, invasión y proliferación celular inducidas por insulina en células MDA-MB-231.....	44
IX.5 Insulina promueve un proceso de migración en células epiteliales no tumorales MCF10A a través de la vía del IR.....	47

IX.6 Insulina induce disminución de los niveles de expresión de E-cadherina.....	49
IX.7 Insulina promueve la activación de FAK y el incremento en la expresión de N-cadherina y vimentina.....	51
IX.8 Insulina promueve un aumento en la activación de NFκB.....	54
IX.9 Insulina promueve invasión celular.....	58
<b>X. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>XI. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>71</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>
<b>XIII.ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
<b>Artículo: Insulin induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A.....</b>	<b>80</b>

## ABREVIATURAS

**AL:** Ácido linoleico.

**DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco.

**DMT2:** Diabetes mellitus tipo 2.

**EFAs:** Ácidos grasos esenciales.

**EMSA:** Ensayo de cambio en la movilidad electroforética.

**FAK:** Cinasa de adhesión focal.

**FFAs:** Ácidos grasos libres.

**HRP:** Peroxidasa de rábano picante.

**IGF-1R:** Receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1.

**INS:** Insulina.

**IR:** Receptor de insulina.

**LB:** Lámina basal.

**MEC:** Matriz extracelular.

**MMPs:** Metaloproteasas de matriz extracelular.

**MUFAs:** Ácidos grasos monoinsaturados.

**NFκB:** Factor nuclear κB.

**PBS:** Amortiguador fosfato salino.

**PUFAs:** Ácidos grasos poliinsaturados.

**TEM:** Transición epitelio-mesénquima.

**TGF-β:** Factor de crecimiento transformante beta.

## I. RESUMEN

Los ácidos grasos participan en diversas funciones celulares, sin embargo, también se ha descrito su implicación en eventos relacionados con la iniciación y progresión tumoral. El ácido linoleico (AL) es un ácido graso poliinsaturado  $\omega$ -6 presente de manera abundante en la dieta; en este sentido, existen numerosos estudios de su participación en la inducción de procesos relacionados con el desarrollo tumoral. Por otra parte, numerosos estudios han indicado una estrecha relación entre la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y el riesgo de padecer cáncer de mama. Así pues, resistencia a la insulina es una de las principales características de la DMT2, aunado a esto, las personas con dicha patología, generalmente son obesas y su dieta es rica en AL así como una vida sedentaria, lo cual también contribuye significativamente a su hiperinsulinemia. Se ha propuesto, en primer lugar, que la insulina puede unirse y activar al receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1R), mecanismo más frecuente para explicar el aumento en el riesgo de padecer cáncer en los pacientes diabéticos. En segundo lugar, la hiperinsulinemia podría aumentar el riesgo de desarrollar cáncer debido a señalización desregulada del receptor de insulina (IR), lo que lleva a efectos anti-apoptóticos y proliferación. En el presente estudio se demostró que los efectos de la insulina se incrementan con un pretratamiento de AL en cultivos de células MDA-MB-231.

Por otra parte, se ha vinculado la participación de la insulina en el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) siendo un proceso mediante el cual las células epiteliales se transdiferencian a un estado mesenquimal. Así pues, la TEM se presenta como un proceso normal durante el desarrollo embrionario, remodelación de tejidos y cierre de herida. Sin embargo, también ha sido implicada durante la progresión del cáncer. Debido a que la insulina ha sido relacionada con el proceso de TEM a través de la señalización del IGF1R, en el presente estudio se demostró que la insulina una disminución en la expresión de E-cadherina, un incremento en la

expresión de vimentina, N-cadherina, y secreción de MMP-2 y MMP-9. Asimismo, indujo la activación de NFκB, de factores de transcripción que se unen a E-box, promovió migración e invasión celular. De esta forma, se demostró que la insulina induce un proceso similar a TEM en células no tumorigénicas epiteliales de mama humana MCF10A y que dicho proceso se encuentra mediado por la señalización inducida por el IR.

## II. ABSTRACT

Fatty acids participate in various cellular functions, however, their involvement in events related to tumor initiation and progression has also been described. Linoleic acid (AL) is a  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acid abundantly present in the diet; In this sense, there are many studies of its participation in the induction of processes related to tumor development. On the other hand, many studies have indicated a close relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM) and the risk of breast cancer. Thus, insulin resistance is one of the main characteristics of T2DM, coupled with this, people with this pathology, obese children and their diet is rich in AL as well as a sedentary lifestyle, which also contribute significantly to its Hyperinsulinemia. It has been proposed, first, that insulin can bind and activate the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-1R), a mechanism most often used to explain the increased risk of cancer in diabetic patients. Second, hyperinsulinemia may increase the risk of developing cancer due to unregulated insulin receptor (IR) signaling, leading to an anti-apoptotic effect and proliferation. In the present study it was shown that the effects of insulin are increased with pretreatment of AL in cultures of MDA-MB-231 cells.

On the other hand, it has been linked to the participation of insulin in the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT) being a process in which epithelial cells are transdifferentiated into a mesenchymal state. Thus, EMT is a normal process during embryonic development, tissue remodeling and wound closure. However, it has also been implicated during cancer progression. Because insulin has been linked to the EMT process through IGF-1R signaling, in the present study insulin was shown a decrease in E-cadherin expression, an increase in the expression of vimentin, N-Cadherin, and secretion of MMP-2 and MMP-9. Also, activation of NF $\kappa$ B, transcription factors that bind to E-boxes, promoted cell migration and invasion. Thus, it is shown that insulin induces a TEM-like process in human tumor-free epithelial cells MCF10A and that the said process is mediated by IR-induced signaling.

### III. INTRODUCCIÓN

#### III.1. Cáncer mamario

El cáncer de mama es una de las enfermedades tumorales más frecuentes, la cual ocupa un lugar preponderante entre las neoplasias que presentan mayor morbilidad y mortalidad en mujeres, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo [1]. Esta patología inicia por un crecimiento tumoral maligno en la glándula mamaria, el cual se manifiesta por una proliferación descontrolada de células, secundaria a mutaciones en los genes anti-oncogenes y proto-oncogenes. Estas mutaciones pueden ser adquiridas durante la vida del individuo y catalogarse como una enfermedad esporádica, o bien ser heredadas de ancestros directos, catalogándose como una enfermedad familiar [2].

El tejido mamario está conformado por glándulas productoras de leche denominados lóbulos y por pequeños túbulos que transportan la leche de los lóbulos al pezón, llamados ductos. Este tejido está constituido por dos capas de células epiteliales; la parte interna contiene a la capa de células epiteliales luminales que se encuentran muy cercanas al lumen de los ductos y de los lóbulos, mientras que en la parte externa se encuentra la capa de células mioepiteliales, que están en contacto con la lámina basal (LB). Estas estructuras están rodeadas por el estroma (tejido adiposo y conectivo), así como por vasos sanguíneos, vasos linfáticos y ciertos tipos celulares como los fibroblastos. En condiciones normales, sólo un 20% de las células luminales se encuentran en contacto con la LB y el resto está en contacto directo con las células mioepiteliales [3].

El cáncer mamario puede originarse a partir de cualquier tipo de célula de la glándula mamaria, sin embargo, los más comunes son los que surgen a partir de células epiteliales ductales. El carcinoma ductal *in situ* representa aproximadamente el 20% de todos los casos y es la forma más común de cáncer no invasivo; mientras que el 80% de los cánceres invasivos son

carcinomas ductales [1]. Debido a sus características fisiológicas, el tejido mamario es particularmente sensible a desarrollar cáncer, factores como los estrógenos y la presencia de un gran número de células no diferenciadas contribuyen a esta susceptibilidad [4].

El cáncer mamario inicia cuando las células son capaces de atravesar la LB, romper matriz extracelular (MEC) que las rodea, invadir el tejido circundante y entrar al torrente sanguíneo y/o linfático e invadir órganos distantes [5]. Este proceso se conoce como metástasis y es la principal causa de muerte de los pacientes con cáncer mamario. El carcinoma mamario puede invadir una gran variedad de órganos, siendo los sitios más comunes hueso, pulmón e hígado [6].

### **III.2 Epidemiología del cáncer mamario**

Actualmente, el cáncer de mama constituye una prioridad en los países desarrollados. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, por el contrario, se ha prestado insuficiente atención a este problema sanitario emergente. La evidencia reciente demuestra que el cáncer de mama es hoy en día una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres de países en vías de desarrollo. En forma paralela, en los últimos años han surgido nuevas opciones terapéuticas y de diagnóstico, sin embargo, muchas de las cuales tienen un costo elevado. Por consiguiente, el cáncer de mama representa un nuevo desafío para el aporte económico del sistema de salud, en particular para los países en desarrollo, tal es el caso de México [5]. En el ámbito mundial, representa el 23% de todos los cánceres y es la principal causa de muerte en mujeres de todo el mundo. La incidencia anual estimada a nivel mundial es de más de un millón de casos, la mitad de los cuales se registran en países industrializados de Norte América (31.3%) y Europa (27.3%). Debido a su alta incidencia, el cáncer mamario, en países desarrollados, es la neoplasia que presenta mayor prevalencia, con un estimado de 4.4 millones de mujeres sobrevivientes

después de 5 años del diagnóstico [5-7]. Una comparación, tanto de los índices de incidencia como de mortalidad del cáncer mamario, muestra una gran variación a nivel geográfico entre áreas de alto y bajo riesgo. La mayor parte de esta variación se debe a la exposición a factores relacionados con el estilo de vida o el medio ambiente, proporcionando un reto para la prevención [6].

En México, la Secretaria de Salud desde el año 2006 sitúa al cáncer mamario como la primera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres, desplazando al cáncer cérvico uterino. El cáncer de mama tiene un elevado índice de mortalidad, 60% de las mujeres que mueren tienen entre 30 y 59 años de edad. Así mismo, en promedio esta neoplasia se presenta en mujeres mexicanas de alrededor de 50 años de edad, una década antes que en mujeres europeas y estadounidenses, estimándose que para el año 2020 tendremos un total de 16,531 nuevos casos [8-10].

La distribución del cáncer mamario está parcialmente relacionada con el desarrollo económico e industrial de la región, dando como resultado que en la Ciudad de México y en los estados del norte del país, en donde existe el mayor número de industrias y la población percibe los mayores ingresos, se presente la mayor incidencia de esta enfermedad [11].

### **III.3 Etiología del cáncer mamario**

El cáncer mamario es una enfermedad multifactorial relacionada con factores genéticos y ambientales, que en conjunto conducen a la acumulación de mutaciones en genes esenciales para la regulación de diversos procesos celulares [12].

### III.3.1 Factores de riesgo genéticos

Aún cuando se conoce poco acerca de la naturaleza y patogénesis del cáncer mamario, se han identificado diversos cambios genéticos que podrían estar involucrados en el crecimiento celular descontrolado. Algunos de los principales genes relacionados con un mayor riesgo de padecer cáncer mamario son: *brca1*, *brca2* y *Her-2*. Las mutaciones en los genes *brca1* y *brca2* son las responsables de aproximadamente el 5% de los casos totales de cáncer mamario y representan únicamente del 20-60% de los casos de cáncer mamario familiar donde se ven afectados múltiples individuos. Esto hace aparente que un gran porcentaje de los cánceres familiares no pueden ser explicados por estas mutaciones, por lo que otros genes de susceptibilidad podrían también estar involucrados [12, 13].

*brca1* es un gen que codifica para una proteína nuclear de 220 kDa con un dominio de dedos de zinc en su extremo amino-terminal y con un extremo carboxilo-terminal conservado que funciona como co-activador transcripcional. Además, se une a proteínas, tales como BRCA2, p53 y RAD51, involucradas en ciclo celular y en respuesta al daño en el DNA. La mutación de este gen se ha relacionado con un 15-20% de casos que presentan una historia familiar de cáncer mamario [14]. Datos experimentales demuestran que células con mutaciones en el gen *brca1* no se arrestan en G2 tras sufrir daño en el DNA y no son capaces de llevar a cabo la reparación del DNA acoplada al proceso de transcripción [15-17].

Por otro lado el gen *brca2* se ha visto implicado en cáncer mamario de forma similar a *brca1*. Las mutaciones en *brca2* se han asociado con un incremento en cáncer de colon, próstata, vejiga, estómago y melanoma maligno [18]. El gen *brca2* no muestra homología con ningún otro gen conocido y codifica para una proteína nuclear de 384 kDa, la cual no contiene dominios funcionales definidos [19]. La proteína BRCA2 es capaz de unirse a BRCA1 y a RAD51 lo que indica su participación en procesos de reparación mediados por recombinación. Además, evidencias obtenidas a

partir de células BRCA2 -/-, las cuales desarrollan anomalías cromosomales importantes tras algunas divisiones celulares, apoyan la participación de la proteína BRCA2 en el mantenimiento de la integridad cromosómica [20, 21].

Por otro lado, el receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidermal humano (Her-2/neu), una glicoproteína transmembranal con actividad de tirosina-cinasa miembro de la familia del receptor al factor de crecimiento epidermal (EGFR), involucrada en la regulación de supervivencia, diferenciación y crecimiento celular a través del envío de señales mitogénicas; se ha visto sobreexpresado en cáncer mamario [22, 23]. La amplificación del gen Her-2/neu está presente en aproximadamente 10-40% de los tumores mamaros primarios y se correlaciona con factores de mal pronóstico [24, 25], entre los que se encuentran, la falta de expresión de receptores a hormonas, la presencia de subtipos histológicos poco diferenciados y proliferación celular elevada [26, 27].

### **III.3.2 Factores de riesgo reproductivos**

El desarrollo de cáncer mamario se encuentra íntimamente relacionado a factores de riesgo ligados con eventos ginecológicos y endocrinológicos en la vida de una mujer. La edad a la que se presenta la primera menstruación está relacionada con la probabilidad de desarrollar cáncer mamario, ya que mujeres que presentan su primera menstruación a una edad menor a los 11 años tienen un riesgo del 10-30% de desarrollar esta patología en su vida. Además, la edad a la que se inicia la menopausia es también un factor importante, ya que mujeres que la experimentan después de los 55 años, tienen 50% más riesgo de desarrollar dicha neoplasia. El embarazo a una edad temprana, especialmente antes de los 30 años reduce la incidencia de cáncer mamario. De manera opuesta, mujeres que nunca experimentan un embarazo o cuyo primer hijo se presenta

después de los 30 años presentan mayor riesgo de desarrollar la patología [28].

Por otro lado, los niveles endógenos de hormonas esteroideas sexuales se han relacionado también con el riesgo de padecer cáncer mamario. Estudios epidemiológicos, en los últimos 10 años, demuestran de forma consistente que niveles elevados de estrógenos y andrógenos están relacionados con un aumento en el riesgo de padecer cáncer mamario. Esta relación entre hormonas esteroideas y carcinoma mamario se encontró principalmente en mujeres postmenopáusicas [29-32]. Sin embargo, esta condición ha sido corroborada recientemente en mujeres premenopáusicas [33], por lo que la exposición a los estrógenos podría aumentar el riesgo a desarrollar cáncer mamario, ya que al unirse a sus receptores y estimular la transcripción de genes involucrados en proliferación celular, incrementan la probabilidad de mutaciones [34]. Por otro lado, se ha demostrado que metabolitos oxidativos de estrógenos son capaces de reaccionar con el DNA, lo que también podría estar actuando como detonador del inicio del cáncer [35].

### **III.3.3 Factores de riesgo relacionados con el estilo de vida**

La diferencia geográfica con respecto a sus índices de incidencia en cáncer mamario se atribuye a la presencia de factores relacionados con el estilo de vida que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad; dichos factores son principalmente, la dieta, la obesidad y el consumo de alcohol [11].

El consumo del alcohol podría aumentar el riesgo de desarrollar cáncer mamario al impedir la acción del sistema inmune, interferir con la reparación del DNA, ayudar a formar productos citotóxicos, estimular el metabolismo de carcinógenos hepáticos (como acetaldehído y la producción de prolactina) y modular la integridad de la membrana celular con efecto en la carcinogénesis. Además, el consumo del alcohol se ha visto ligado a un

incremento en los niveles de estrógenos en suero de mujeres postmenopáusicas [36].

Por otra parte, estudios epidemiológicos indican que mujeres con dietas ricas en ácidos grasos presentan un mayor riesgo de padecer cáncer mamario, el cual puede ser hasta cinco veces mayor con respecto a mujeres con consumos bajos en grasas [37, 38]. Estudios en modelos animales y en mujeres pre y postmenopáusicas han revelado que una reducción en el consumo de grasas puede disminuir la incidencia de tumores, probablemente al reducirse los niveles de estradiol en suero [39]. Asimismo, el consumo de grasas está relacionado directamente con la obesidad, misma que en mujeres postmenopáusicas, ha sido asociada con un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer mamario [40]. Un estudio reciente (meta-análisis) demostró que la mortalidad específica por cáncer de mama incrementó alrededor de un tercio en mujeres obesas, en comparación con mujeres de peso normal. De esta manera se han postulado distintos mecanismos biológicos para explicar la asociación entre la obesidad y el cáncer de mama, incluyendo mediadores fisiológicos potenciales como: (i) estrógeno (estrógeno total o un incremento en el nivel de estrógeno libre como resultado de una disminución, asociada a la obesidad, en la unión de las hormonas sexuales y la globulina), (ii) miembros de la familia insulina/IGF, (iii) adipocitocinas tales como la leptina que son secretadas por adipocitos e (iv) inflamación (reflejada por un incremento en marcadores como la proteína C-reactiva) [41]. En este sentido, el cambio en el estilo de vida con un incremento en el consumo de grasas y calorías así como la disminución en la actividad física, no sólo aumenta la aparición de la obesidad sino también de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Numerosos estudios han indicado que existe un vínculo entre la DMT2 y el riesgo de padecer algunos tipos de cáncer. Algunos de los mecanismos propuestos de dicha relación la resistencia a la insulina y su subsecuente hiperinsulinemia. En los pacientes con DMT2, la resistencia a insulina está restringida a la vía metabólica, mientras que la vía de señalización del receptor de insulina que está

asociada con sobrevivencia celular, crecimiento y migración, no se encuentra afectada. Dado lo anterior, el receptor de insulina, que a menudo está sobre-expresado en algunas células cancerosas, podría jugar un papel importante en la promoción del desarrollo de cáncer vía incremento en los niveles de insulina [42].

### **III.3.3.1 Ácidos grasos y cáncer**

Los ácidos grasos desempeñan funciones de suma importancia en muchos tejidos, regulando diversos procesos biológicos como el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación celular [43-45]. Estos ácidos grasos son los componentes estructurales básicos de los triglicéridos y se encuentran también en los fosfolípidos y los ésteres de colesterol. Éstos poseen una estructura conformada por una cadena de carbono (cuya longitud varía entre 2 y 36 átomos de carbono) con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro [46]; siendo divididos por su estructura en saturados, cuando no poseen ningún doble enlace en su estructura; e insaturados, porque poseen uno o más dobles enlaces. Éstos últimos se clasifican en ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), los cuales presentan solo un doble enlace en la estructura de la molécula; y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que cuentan con dos o más dobles enlaces [47]. Los ácidos grasos esenciales (EFAs) son PUFAs y son necesarios para la vida, no pueden ser sintetizados de forma endógena [45], por ello deben ser obtenidos de la dieta; es por eso que reciben el nombre de esenciales [46]. Existen dos tipos principales de EFAs, los de la serie  $\omega$ -6 y los de la serie  $\omega$ -3; entre éstos el ácido graso  $\omega$ -6 más importante es el AL por ser el más abundante en la dieta. El AL es un ácido graso poli-insaturado de dieciocho carbonos con dos dobles enlaces, el cual se encuentra en grandes cantidades en el aceite de soya, aceite de semilla de girasol, aceite de cártamo, aceite de onagra, aceite de semilla de uva y aceite de semilla de amapola; y en menores cantidades en el aceite de germen de trigo, aceite de maíz, aceite de nuez, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo [47],

también se encuentra presente en cereales, huevos, carne de aves, pan de granos enteros, productos horneados y margarina [48].

Los ácidos grasos también ejercen sus funciones directamente a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). De manera reciente, se ha descrito a un grupo de receptores de ácidos grasos acoplados a proteínas G que se encargan de regular diversas funciones: FFAR1 (receptor de ácidos grasos libres 1, anteriormente conocido como GPR40), FFAR2 (anteriormente denominado GPR43), FFAR3 (anteriormente GPR41) y GPR120 [49]. FFAR1 y GPR120 son activados por ácidos grasos de cadena mediana y larga [50-53]. Los análisis farmacológicos de FFAR1 y su distribución en los tejidos sugieren que este receptor juega un papel muy importante en la función de las células  $\beta$ -pancreáticas y en la función neurológica [49, 50, 52, 53]. Por su parte, GPR120 se expresa en las células endocrinas del intestino promoviendo la secreción del péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) [50]. Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas Gi/G0 y Gq/G11 respectivamente, por lo que su interacción con sus respectivos ligandos resulta en la activación de diversas vías de señalización con efectos biológicos variados [53, 54]. Sin embargo, también se ha reportado que tanto FFAR1 como GPR120 están expresados en líneas celulares de cáncer de mama y su presencia en estas células está asociada con la activación de diversas vías de señalización que dan como resultado la inducción de proliferación, evasión de la apoptosis, invasión, metástasis y migración [52, 55-57].

Recientes estudios epidemiológicos han demostrado una asociación positiva entre los PUFAs  $\omega$ -6 presentes en la dieta y el riesgo de desarrollar cáncer de mama [48, 55, 58-61]. Chajès *et al.* [61] demostró una relación entre el aumento en la ingesta de PUFAs  $\omega$ -6 y el incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres mexicanas; mientras que en un estudio realizado en un cohorte de mujeres chinas se observó un aumento significativo en el riesgo de padecer cáncer de mama en los sujetos que consumían niveles bajos de PUFAs  $\omega$ -3 y una ingesta alta de  $\omega$ -6 [58]. Las

conclusiones de estos y otros estudios han llevado a sugerir que los ácidos grasos  $\omega$ -6 participan en la etiología, evolución y/o progresión del cáncer de mama, así mismo, que la tumorigénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis dependen de la cantidad y el tipo de ácido graso consumido [48]. Por otro lado, también hay evidencia proveniente de estudios experimentales que sustentan esta asociación [52, 55-57, 62-67].

### **III.3.3.2 Hiperinsulinemia y cáncer**

Un número creciente de estudios han indicado un vínculo entre DMT2 y el riesgo de padecer algunos tipos de cáncer. En efecto, se ha observado una asociación entre el estatus diabético y un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer pancreático, hepatocelular, endometrial y de vejiga [67]. Por otro lado, algunos estudios han asociado a pacientes con DMT2 con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer mamario [68]. Michels y colaboradores en el 2003, evaluaron en prospectiva la asociación entre DMT2 y cáncer de mama invasivo. Mujeres con DMT2 tenían un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con mujeres no diabéticas [69].

La asociación fisiopatológica del estatus diabético con el desarrollo de cáncer no se conoce claramente. Numerosos mecanismos han sido propuestos para la explicación de esta relación, siendo la resistencia a la insulina y su subsecuente hiperinsulinemia- uno de los sugeridos más comúnmente.

La insulina es una hormona peptídica de 5.8 KDa, y es secretada por células  $\beta$  en los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre. Su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, entre 80-105 mg/dL favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en músculo y tejido adiposo y en hígado se favorece su almacenamiento y se inhibe su producción. Además, regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, así como también promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos [70].

La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular, el receptor de insulina (IR) y el receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1R). Estos receptores presentan aproximadamente un 80% de homología y su sitio de unión a ATP es 100% conservado; esta similitud estructural les permite formar receptores híbridos IGF-1R/IR [71]. Tanto el IR como el IGF-1R pertenecen a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de tirosina (Tyr) (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr (Figura 1) [72].

Tanto el IR como el IGF-1R son heterotetrámeros que consisten en dos subunidades  $\alpha$  extracelulares y dos subunidades transmembranales  $\beta$  unidas entre sí por puentes disulfuro [73, 74]. El IR, que a menudo es sobre-expresado en algunas células cancerosas, puede tener un papel importante en la promoción del desarrollo del cáncer vía el incremento en los niveles de insulina, así como también ésta presenta una mayor afinidad por el IR que por el IGF-1R [64].

El IR se presenta en dos isoformas dadas por "splicing" alternativo, las cuales son: la isoforma A (IR-A), carente del exón 11, y la isoforma B (IR-B), que contiene el exón 11. El "splicing" del IR es un mecanismo evolucionario conservado en mamíferos que es responsable de la especificidad de la señalización de insulina e IGF [75].

La DMT2 se caracteriza por resistencia a insulina, aunado a esto las personas con DMT2 por lo general son obesas y llevan una vida sedentaria, lo cual también contribuye a su hiperinsulinemia. Se ha propuesto, en primer lugar, que la insulina puede unirse y activar al IGF-1R, este es el mecanismo más frecuentemente propuesto para explicar el aumento en el riesgo de desarrollar cáncer en los pacientes diabéticos. En segundo lugar, la hiperinsulinemia podría aumentar el riesgo de padecer cáncer por la señalización desregulada del IR, lo que lleva a efectos anti-apoptóticos y de proliferación.

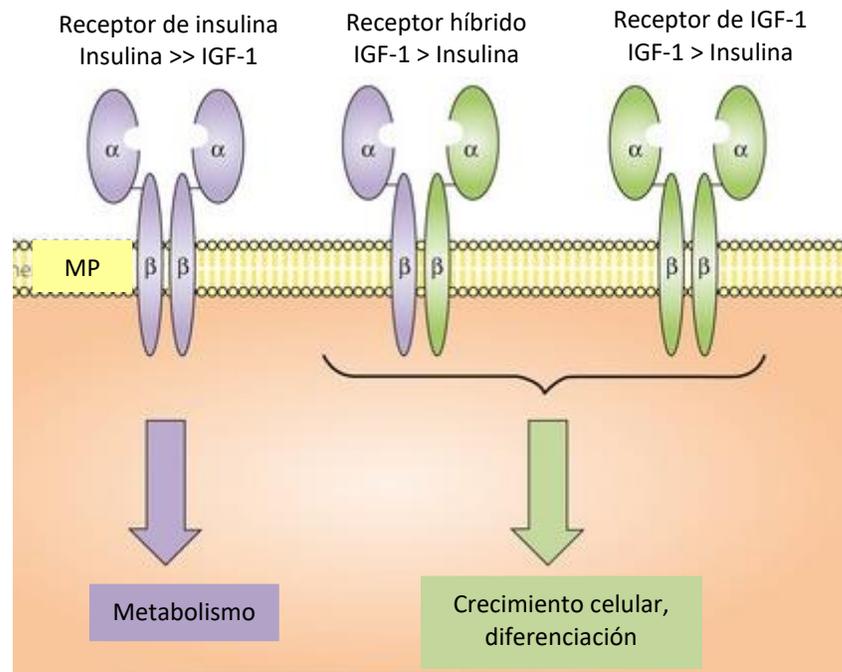


Figura 1. Señalización de los receptores IR e IGF-1R. Tanto el IR como el IGF-1R son codificados por diferentes genes que los procesan en una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  unidas entre sí por puentes disulfuro. Estos complejos  $\alpha/\beta$  pueden homodimerizarse para formar receptores de insulina o receptores de IGF, o bien heterodimerizarse para formar receptores híbridos. La insulina se une preferentemente al IR, mientras que el IGF-1 se une preferencialmente al IGF-1R y a los receptores híbridos. Modificado de Noto H, 2013 [76].

### III.4 Metástasis

La carcinogénesis involucra el aumento de cambios genéticos y epigenéticos que llevan a la desregulación del control normal del número de células. La mayoría de los tumores mamarios son de origen luminal y comienzan regularmente con el crecimiento y multiplicación descontrolada. En esta etapa se considera un tumor benigno que puede ser extirpado para evitar mayores complicaciones. El cáncer como tal, ocurre en el momento en que estas células que proliferan sin control, adquieren la capacidad de llevar a cabo la metástasis. La metástasis es un proceso sumamente complejo, en el que las células

cancerosas se desprenden de las células vecinas, rompen la lámina basal que las rodean, atraviesan los vasos sanguíneos o linfáticos, viajan a través del torrente sanguíneo y en un momento dado se adhieren a un vaso sanguíneo de otro órgano y al atravesarlo inician la proliferación en este nuevo órgano. La metástasis es la principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer de mama [77]. El proceso metastásico comprende varios pasos incluyendo el escape del sitio del tumor primario, la degradación de la membrana basal y la invasión del estroma local, la entrada a vasos linfáticos o sanguíneos locales (intravasación), agregación con plaquetas, interacción y adhesión a endotelio distante, extravasación, recolonización y expansión (Figura 2) [78].

Para diseminarse, las células tumorales deben tener la capacidad de liberarse del tejido de origen. La adhesión entre células se reduce por la pérdida de proteínas de anclaje que las une, como E-cadherina. Esta pérdida puede darse por diversos mecanismos, incluyendo mutaciones genéticas o silenciamiento epigenético del gen que la codifica [79, 80]. La pérdida de actividad de E-cadherina también ocurre como parte de la transformación de células cancerosas de un estado epitelial a uno con mayor movilidad; un cambio conocido como “transición epitelio-mesénquima (TEM)” [81, 82].

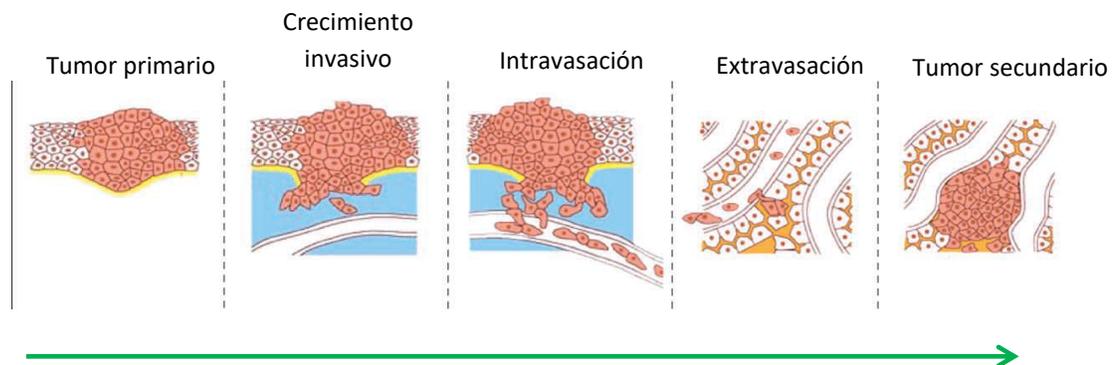


Figura 2. Proceso metastásico. Las células del tumor primario se liberan y degradan la membrana basal invadiendo el tejido adyacente hacia los vasos sanguíneos o linfáticos. Posteriormente, estas células mediante intravasación ingresan al torrente circulatorio para dirigirse hacia un sitio lejano. Finalmente,

mediante extravasación salen del torrente circulatorio para colonizar y generar un tumor secundario. Modificado de Huber MA, 2005 [83].

### III.4.1 Transición epitelio-mesénquima (TEM)

La TEM es un proceso biológico que permite a las células epiteliales polarizadas, las cuales normalmente interactúan con la membrana basal (MB) por medio de su superficie basal, experimentar diferentes cambios bioquímicos que permiten adquirir el fenotipo mesenquimal, el cual incluye la capacidad de migración, invasión y elevada resistencia a la apoptosis [84]. El resto del proceso de la TEM está caracterizado por la degradación de la MB mediada por metaloproteinasas (MMPs) y la formación de una “célula mesenquimal” que puede migrar más allá de la capa epitelial de la que se originó (Figura 3).

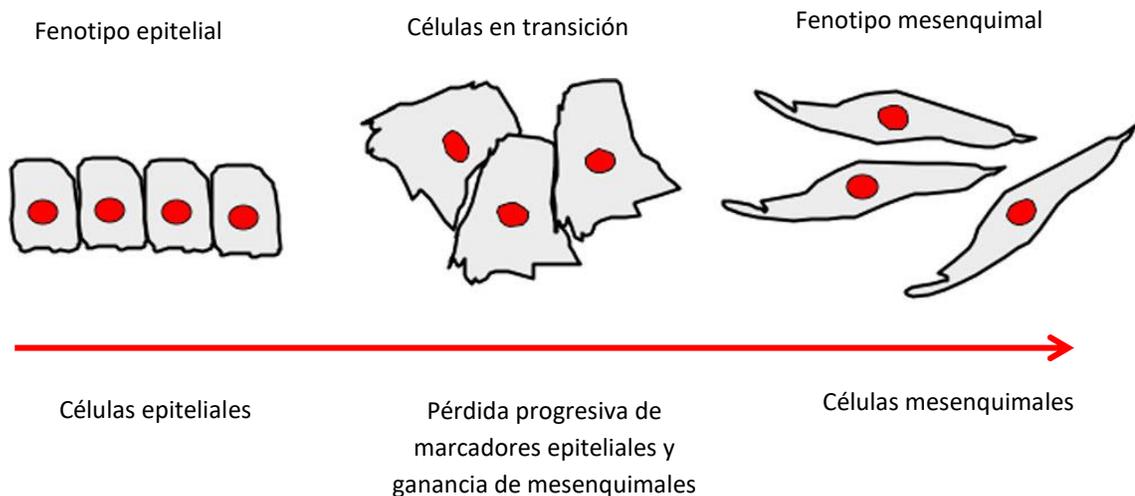


Figura 3. Transición epitelio-mesénquima. Proceso que consiste en la pérdida de marcadores epiteliales (E-cadherina, claudinas, ZO) y ganancia de marcadores mesenquimales (N-cadherina, vimentina, MMPs), además de cambios en el citoesqueleto como el rearreglo de la actina cortical presente en células epiteliales a fibras de estrés presente en células mesenquimales. Modificado de Lee JM, 2006 [85].

La clave para la TEM es la reducción de la adhesión célula-célula mediante la represión transcripcional de cadherinas (uniones adherentes), ocludinas y claudinas (uniones estrechas) y desmoplakinas (desmosomas) [86]. Las fibras de F-actina del citoesqueleto son reemplazadas por una red de fibras de estrés regulada por Rho, en el frente de migración se localizan moléculas de adhesión a la MEC, incluyendo integrinas  $\alpha\beta6$ , fascina, FAK y cinasa ligada a integrinas (ILK). Estos cambios son suficientes para que las células se separen, pierdan la polaridad apicobasal y adquieran una forma más alargada para facilitar una mayor migración celular [87]. La expresión de filamentos intermedios también cambia durante la TEM, como vimentina y citoqueratinas 5, 6, 14, 15 y 17 que son típicas de células mesenquimales, mientras que las citoqueratinas epiteliales 8 y 18 están desreguladas en este proceso [88]. Las MMPs, como las 1, 2, 3, 7, 9 y 14 expresadas en la TEM, lo que permite a las células penetrar la membrana basal [89].

Por otra parte, E-cadherina (cadherina epitelial) es necesaria para mantener la integridad del epitelio en muchos tejidos adultos y embrionarios. La TEM se caracteriza por la pérdida de E-cadherina, la cual puede deberse a procesos como el corte proteolítico anormal, pérdida de heterocigocidad y mutaciones que inactivan E-cadherina, siendo el mecanismo más estudiado el silenciamiento transcripcional. La pérdida en la expresión de E-cadherina a nivel transcripcional se ha observado en diversas líneas celulares de cáncer humano, incluyendo cáncer de próstata, mama, colorectal y de tiroides [90].

Durante la progresión del cáncer, la TEM puede ser inducida por diversos estímulos (Figura 4). Existen moléculas secretadas como el factor de crecimiento epidermal (EGF), miembros de la familia de TGF- $\beta$ , Wnt, factor de crecimiento de fibroblastos y IGF que son capaces de inducir TEM [88].

En el cáncer de mama, la unión del TGF- $\beta$  a sus receptores en la superficie celular resulta en la localización nuclear de proteínas Smad, las cuales activan la expresión de factores de transcripción supresores de E-cadherina, como es el caso del factor de transcripción Snail 1 cuya sobreexpresión se relaciona con tumores de mama metastásicos e invasivos de humanos [91, 92].

Por otra parte, la activación del factor de transcripción NFκB es necesaria para mantener el fenotipo invasivo inducido por Ras. La inhibición de NFκB en células epiteliales transformadas por Ras lleva una reducción de diez veces en la metástasis de tumores de mama humanos [93]. Además, la sobreexpresión de una forma constitutiva de NFκB p65 en células MCF10A resultó en el incremento de vimentina y un fenotipo mesenquimal con tumores de mama metastásicos e invasivos de humanos [94].

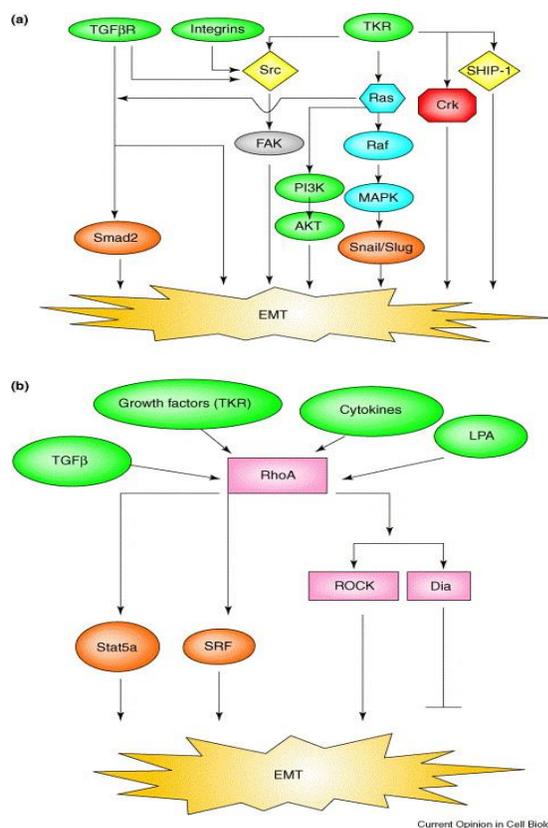


Figura 4. Vías de señalización de la TEM. (a) Receptores de tirosina cinasa (RTK), el receptor de TGFβ (TGFβR) y las vías de señalización de las integrinas pueden llevar a cabo un proceso de TEM. (b) Distintas vías de señalización pueden converger en un único componente pero dirigir a resultados diferentes. RhoA, que se muestra aquí como un ejemplo de un blanco inicial en la vía de transducción de la TEM, puede inducir o antagonizar la TEM de acuerdo con su nivel de activación [95].

## IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer mamario se ha constituido como un problema de salud pública a nivel mundial; entre los factores de riesgo asociados a esta enfermedad que han cobrado importancia en los últimos años destacan los relacionados con el alto consumo de azúcares y grasas saturadas, característico de las dietas occidentales, las cuales se han asociado a estados de obesidad, DMT2, y desorden metabólico que, a su vez, se caracterizan por hiperinsulinemias y altas concentraciones de ácidos grasos libres en circulación sanguínea, como es el caso del ácido linoleico (AL). Aunado a esto, existe evidencia proveniente de estudios epidemiológicos y de tipo experimental que han demostrado una estrecha relación entre los ácidos grasos e hiperinsulinemia con un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Diversos estudios han demostrado el papel de varios ácidos grasos así como de niveles elevados de insulina en procesos clave de la progresión tumoral como proliferación, evasión de apoptosis, invasión y migración. Estos resultados han demostrado la participación de varias vías de señalización que favorecen dichos efectos celulares; sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para entender los mecanismos específicos involucrados en estos eventos, de manera puntual los que son desencadenados por la acción de la insulina que es una de las principales moléculas desregulada en obesidad, DMT2 y que de manera reciente se ha relacionado estrechamente con procesos neoplásicos.

Por lo anterior, en el presente trabajo analizamos la participación de la insulina en los procesos de migración/invasión en células tumorales mamarias MDA-MB-231 pretratadas con ácido linoleico. De la misma forma, se evaluó la participación de la insulina como inductor de la TEM en células no tumorales MCF10A, siendo un paso clave durante la metástasis, la cual que es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer de mama y cuyos tratamientos para su prevención no han sido efectivos.

## V. HIPÓTESIS

El AL promueve un incremento en la respuesta a los procesos de migración e invasión inducidos por la insulina en células cancerosas mamarias MDA-MB-231, lo que resulta en un aumento en la capacidad metastásica de dichas células. Así mismo, la insulina induce un proceso similar a la transición epitelio-mesénquima a través de la vía de señalización del IR en células epiteliales mamarias no tumorales MCF10A.

## **VI. OBJETIVOS**

### **VI.1 Objetivo general**

Evaluar la participación de la insulina en procesos cancerígenos tanto en células de cáncer de mama MDA-MB-231 como en células epiteliales mamarias no tumorales MCF10A.

### **VI.2 Objetivos particulares**

- ❖ Estudiar la expresión de los receptores de insulina en células MDA-MB-231 pre-tratadas con AL.
- ❖ Evaluar la participación de la insulina en los procesos de invasión, migración y proliferación en células MDA-MB-231 pre-tratadas con AL.
- ❖ Determinar si la insulina induce migración en células no tumorales MCF10A.
- ❖ Analizar la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en células MCF10A tratadas con insulina.
- ❖ Demostrar que la insulina promueve un proceso de TEM a través del IR en células no tumorales MCF10A.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.1 Material biológico

Línea Celular	Características
<b>MDA-MB-231</b>	Línea celular humana de cáncer mamario invasivo.
<b>MCF7</b>	Línea celular humana de cáncer mamario no invasivo.
<b>MCF10A</b>	Línea celular humana no tumorigénica de epitelio mamario.
<b>MCF12A</b>	Línea celular humana no tumorigénica de epitelio mamario.

### VII.2 Reactivos.

Reactivo	Fuente de adquisición
Insulina	Sigma (St. Louis, MO)
NDGA	Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA)

PP2	Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA)
AH7614	TOCRIS (Minneapolis, USA)
Ácido linoleico	99% de pureza
Anti-IR $\beta$	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
Anti-IGF-1R $\beta$	Cell Signaling (Danvers, MA)
Anti-actina	Donado generosamente por el Dr. Manuel Hernández (CINVESTAV-IPN)
Anti-E-caderina	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
Anti-N-cadherina	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
Vimentina	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
Anti-FAK	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
Anti-p-FAK <sup>Tyr 397</sup>	Invitrogen (Camarillo, CA)
Faloidina rodaminada	Sigma (St. Louis, MO)
Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa HRP	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
HNMPA-(AM)3	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

	Cruz, CA)
Reactivo de ECL	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
ATP [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]	Perkin-Elmer (Boston, MA)

### VII.3. Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer mamario MDA-MB-231 y MCF7 fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Mientras que células no tumorigénicas de epitelio mamario MCF10A y MCF12A fueron cultivadas en medio DMEM/F12. En todos los casos el medio fue suplementado con 3.7 g/l de bicarbonato de sodio, 5% de suero fetal bovino (SFB) y una mezcla de antibióticos en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de aire a 37°C. Para propósitos experimentales, los cultivos de células MDA-MB-231 y MCF7 fueron ayunados durante 24 horas previas al pretratamiento con AL y posterior tratamiento con insulina. Las células MCF10A y MCF12A fueron ayunadas durante 4 horas en medio DMEM/F12 sin suplementos antes de su respectivo tratamiento.

### VII.4 Ensayos de estimulación con ácido linoleico e insulina

Cultivos confluentes de células MDA-MB-231, previamente ayunados, fueron lavados dos veces con buffer fosfato salino (PBS) y pretratadas con AL durante 20 horas. Posteriormente se realizó la estimulación con insulina durante 24 horas. Las células MCF12A y MCF7 fueron ayunadas y tratadas con AL a diferentes tiempos. En el caso de la línea celular MCF10A, los cultivos fueron tratados con insulina a las concentraciones y los tiempos indicados posterior a su ayuno. La estimulación culminó con el aspirado del

medio (medio condicionado), obteniendo extractos nucleares o extractos totales según el caso.

## **VII.5 Obtención de extractos totales**

Una vez aspirado el medio, las células fueron lisadas en 500  $\mu$ l de buffer RIPA (HEPES 50mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1mM, ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 100 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, glicerol 10%, Tritón-X100 1%, desoxicolato de sodio 1%,  $MgCl_2$  1.5 mM, PMSF 1 mM) para la obtención de las proteínas totales. Los lisados fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue colectado en microtubos de plástico. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de micro Bradford [64].

## **VII.6 Western Blot**

Después de los tratamientos las células fueron recuperadas y lisadas con buffer RIPA frío. Las proteínas obtenidas fueron mezcladas con buffer de carga (Tris-HCl 200 mM pH 6.8, EDTA 1 mM, SDS 6%, 2-mercaptoetanol 4%, glicerol 10%) y cargadas en un gel SDS-PAGE al 8% para electroforesis, para posteriormente ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda (BioRad). Posteriormente, se realizó la tinción de las membranas con rojo de Ponceau para verificar la eficiencia en la transferencia de las proteínas. Para evitar interacciones inespecíficas, se cubrieron los sitios irrelevantes incubando las membranas durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo usando 3% de leche baja en grasa en PBS/Tween 20 al 0.1%. Después de un breve lavado con PBS, las membranas fueron incubadas durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente; posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS/Tween al 0.1%. Para la detección de las proteínas de interés se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) en

PBS/Tween 20 al 0.1% durante dos horas en agitación constante. En seguida, las membranas fueron lavadas tres veces con PBS/Tween 20 al 0.1%. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas usando los reactivos de detección de quimioluminiscencia. La intensidad relativa de las bandas resultantes fue determinada usando los programas ImageJ (NIH, USA) y GraphPad Prism.

### **VII.7 Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”**

Una vez que los cultivos celulares alcanzaron el 100% de confluencia en cajas de 35 mm, las células fueron sometidas a supresión con DMEM sin suero durante 24 horas para los cultivos de MDA-MB-231 y MCF7 y con DMEM/F12 sin suero durante 4 horas para las células MCF10A. Después se trataron con 12  $\mu$ M de mitomicina C durante 2 horas para evitar la proliferación celular. Posteriormente, se realizó una rayadura de manera manual en el centro de la caja utilizando una punta estéril de 200  $\mu$ L y se lavó dos veces con PBS 1X para remover las células suspendidas. Finalmente, a cada cultivo se le dió el tratamiento correspondiente, transcurrido el periodo necesario en cada caso, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y teñidas con azul de Coomassie. El progreso de la migración celular en la herida fue fotografiado usando un microscopio invertido acoplado a una cámara, y la migración celular fue cuantificada utilizando el programa ImageJ (NIH,USA).

### **VII.8 Ensayo de migración en cámara de Boyden**

Los ensayos de migración se efectuaron en cámaras de Boyden con filtro de poro de 0.8  $\mu$ m de diámetro. Los cultivos celulares fueron sometidos a supresión de suero durante 24 h, para el caso de las células MDA-MB-231 y 4 h para células MCF10A. Dos horas previas al experimento, las células

fueron tratadas con mitomicina C. Transcurrido este tiempo, las células fueron despegadas con tripsina 0.25% y verseno 0.02% y se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer para posteriormente colocar 100,000 células en la parte superior de la cámara resuspendidas en medio DMEM sin suero para células MDA-MB-231 y DMEM-F12 sin suero para células MCF10A. En la parte inferior de la cámara se colocaron 500  $\mu$ l con las diferentes condiciones de pre-tratamiento con AL y estimulación con insulina. Las células se incubaron durante 20 horas a 37°C con un pretratamiento de AL y 24 horas con insulina, tras lo cual se aspiró el medio de los dos compartimientos. En el caso de las células MCF10A el ayuno se realizó durante 4 h en medio DMEM-F12 libre de suero, se estimularon con insulina e incubaron durante 48 h. Las células fueron fijadas con metanol frío durante 5 min para posteriormente remover de la parte superior de la cámara las células que no migraron utilizando un hisopo de algodón. Una vez realizado este procedimiento, las células contenidas en la parte inferior fueron teñidas con cristal violeta 0.1% durante 10 min. Las membranas fueron lavadas 4 veces con agua bidestilada y el colorante fue eluido con 200  $\mu$ l de ácido acético al 10%, la solución resultante se analizó empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Los resultados se graficaron respecto al basal y se les realizó análisis estadístico.

## **VII.9 Zimografía en gelatina**

Los cultivos confluentes de células MDA-MB-231 y MCF10A fueron ayunados y lavados dos veces con PBS 1x y tratados según el caso. Las células MDA-MB-231 fueron sometidas a un pretratamiento con AL durante 20 horas y estimuladas con insulina durante 24 h más. Por otro lado, los cultivos de células MCF10A fueron tratados con insulina a diferentes tiempos. Después de la estimulación los medios condicionados fueron colectados y concentrados usando filtros Centricon (Millipore). La actividad proteolítica fue analizada usando el medio condicionado en geles de poliacrilamida al 8%

copolimerizado con gelatina a una concentración de mg/mL [96]. Brevemente, volúmenes iguales de medios condicionados sin calentar fueron mezclados con buffer de muestra (SDS 2.5%, sacarosa 1%, rojo de fenol 4µg/ml) sin agentes reductores y se corrieron en geles de acrilamida al 8% copolimerizado con gelatina. Después de la electroforesis a 85 V durante 2 horas, los geles fueron lavados tres veces con Tritón X-100 al 2.5% durante 30 min a temperatura ambiente para quitar el SDS. Posteriormente, los geles fueron incubados en amortiguador de activación de MMPs (Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.4) a 37°C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie brillante azul G-250 en ácido acético 10% y metanol 30%. La actividad proteolítica de las MMPs fue visualizada como bandas translúcidas en un fondo teñido sin degradar. Las imágenes fueron capturadas utilizando un analizador de imágenes BioRad.

## **VII.10 Ensayo de invasión**

El ensayo de invasión celular fue llevado a cabo mediante el método de cámara de Boyden modificado en placas de cultivo de 24 pozos que contenían 12 insertos con una membrana con poros de 8 µm de diámetro (Costar Corning Inc.). Brevemente, se adicionaron 30 µl de BD Matrigel a una concentración de 7 mg/mL en la parte superior de los insertos y se dejaron en incubación a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, las células sujetas a ayuno fueron colocadas en la parte superior de la cámara a una concentración de 1 x 10<sup>5</sup> células/pozo resuspendidas en 100 µl de DMEM o DMEM-F12 sin suero (según el caso), mientras que en la parte inferior fueron colocados los pretratamientos con AL y estímulos con insulina correspondientes. A continuación, las células fueron incubadas por 44 h para células MDA-MB-231 y 30 h para células MCF10A a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células que permanecían sobre el matrigel fueron retiradas con ayuda de un hisopo, mientras que las células que invadieron hacia la parte

inferior del inserto fueron lavadas con agua MilliQ y fijadas con metanol frío durante 5 minutos. La cuantificación de células que invadieron fue cuantificado mediante la tinción con cristal violeta al 0.1% en PBS. Una vez teñidas, el colorante fue eluido con 500 µl de ácido acético al 10%, y la absorbancia fue evaluada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. El valor de fondo fue obtenido de los pozos sin células. Los resultados se graficaron como promedio de las absorbancias.

### **VII.11 Ensayo de proliferación**

Cultivos de células MDA-MB-231 fueron llevados a confluencia en placas de 96 pozos con un volumen final de 10 µl de medio de cultivo. Después del ayuno, los cultivos fueron lavados dos veces con PBS, y las células fueron equilibradas en medio de cultivo DMEM sin suero por al menos 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las células fueron pretratadas con 90 µl de AL durante 20 h. Posteriormente, las células fueron lavadas y estimuladas con insulina por 24 h. Una vez concluido el periodo de estimulación, se adicionaron 10 µl del reactivo WST-1 en cada pozo. Finalmente, los cultivos fueron incubados durante 0.5-4 h y se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

### **VII.12 Preparación de extractos nucleares para EMSA**

Los cultivos de células MCF10A fueron lisados en 500 µl de buffer hipotónico (Tris-HCl 10 mM pH 7.0, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, NaF 3.2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM) e incubados durante 10 minutos a 4°C para después adicionarles 5 µl de IGEPAL al 10% y agitarlos suavemente durante 5 minutos. Posteriormente fueron centrifugados a 2,600 rpm durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante (fracción citoplásmica) fue descartado, y la pastilla (fracción nuclear) fue lavada dos veces con el buffer hipotónico para eliminar los residuos citoplásmicos. Los extractos nucleares fueron obtenidos mediante la adición de 40

µl de buffer hipertónico (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 420 mM, glicerol 20%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM) con agitación vigorosa durante 15 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y cuantificado mediante el método de micro-Bradford.

### **VII.13 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)**

5 µg de los extractos nucleares obtenidos fueron incubados con 1 pg de oligonucleótidos de doble cadena con sitios específicos para NFκB (5'-AGCTAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGG-3') y para E-box (5'-GTGATGACACCTGCCTGTAGCATTCCA-3') marcados previamente con ATP [<sup>32</sup>P] [12, 13] usando la enzima polinucleótido cinasa T4, junto con 3 µg de poli (dl-dC), HEPES 0.25 M pH 7.5, KCl 0.6 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 7.5 mM y glicerol 9% por 20 minutos. Un exceso de cien veces de oligonucleótido sin marcar (NFκB o E-box) y oligonucleótido irrelevante fueron usados como competidores específico y no-específico, respectivamente. Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida al 6% en buffer TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 0.5X; los geles fueron secados y analizados por autorradiografía.

### **VII.14 Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y PCR tiempo-real (RT-qPCR)**

El RNA total fue extraído de las células mediante el método de un solo paso, usando el reactivo Trizol (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y posteriormente se analizará su integridad y pureza utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para la PCR en tiempo real, la expresión relativa de genes fue determinada usando el kit SYB Green PCR Master Mix (BioRad) en un termociclador Applied Biosystems 7300 Real-time PCR System de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La amplificación fue realizada por 40 ciclos de 3 minutos a 95°C, 60 segundos a

60°C y 3 minutos a 72°C. Los *primers* utilizados se enlistan en la tabla 1 y se usaron 12.5 pmol/μl de cada uno. Cada una de las muestras fue realizada por triplicado y la estandarización de los niveles de expresión génica fueron normalizados con respecto a los datos que se obtuvieron de la amplificación del gen de β-actina.

<b>Tabla de oligonucleótidos usados para PCR tiempo-real</b>		
Gen	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
E-cadherina	CGACCAACACAAGAATCTA	CCCCGTCAGAACATAACTTT
Snail1	GCGAGCTGCAGGACTCTAAT	CCTGTGTCCTCATCTGACA
Snail2	TTCGGACCCACCCATTACCT	TTGGAGCAGTTTTTGC ACTG
Twist1	GGAGTCCGCAGTCTTCCGAG	TGGAGGACCAGGTAGAGGAA
Twist2	AGCAAGAAGTCGAGCCAAGA	CAGCTTGAGCGTCTGGATCT
Sip1	AATGGCAACAGCAACAAGTG	CCCCGTCAGAACATAACTTT
ZEB1	GCACAACCAAGTGCAGAAGA	CATTTGCAGATTGAGGCTGA
β-actina	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

## **VII.15 Microscopía confocal**

Células MDA-MB-231 y células MCF10A fueron sembradas y una vez que alcanzaron el 70% de confluencia, las células MDA-MB-231 fueron ayunadas y pretratadas con AL 90 μM durante 20 horas, posteriormente se retiró el medio y se colocó medio DMEM fresco con insulina 340 nM durante 24 h, considerando las siguientes condiciones: Control, insulina, AL y AL-insulina. En el caso de los cultivos MCF10A las células fueron estimuladas con insulina 300 nM y sometidas a un ensayo de cierre de herida. Una vez concluida la estimulación, en ambos casos, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min, y lavadas 3 veces con PBS 1X. Posteriormente se adicionó a las células el anticuerpo anti-IRβ (Dil 1:100),

anticuerpo anti-IGF-1R $\beta$  (Dil 1:100), anticuerpo anti-vimentina (Dil 1:100) anticuerpo acoplado a FITC (Dil 1:100) y faloidina rodaminada (Dil 1:200) según el caso, dejándolas en cámara húmeda toda la noche a 4 °C. Una vez terminadas las tinciones, los cubreobjetos fueron montados en un portaobjetos donde previamente se había colocado una gota de Vecta Shield. Las células fueron observadas utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2.

### **VII.16 Análisis estadístico**

Los resultados son expresados como promedio  $\pm$  D. E. Los datos fueron analizados estadísticamente usando la prueba ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunnett. La probabilidad estadística  $P < 0.05$  fue considerada significativa. Todo el análisis estadístico fue realizado de un mínimo de tres experimentos independientes.

## VIII. RESULTADOS

### VIII.1 El AL induce un incremento en la expresión de IR e IGF-1R en células cancerosas mamarias MDA-MB-231

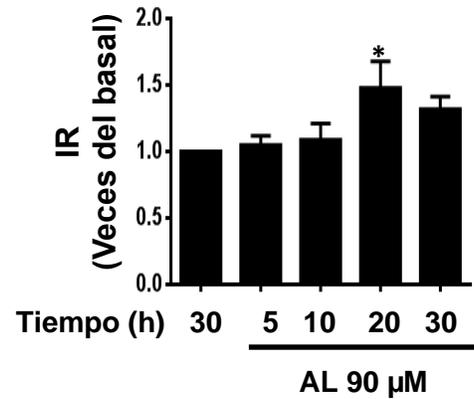
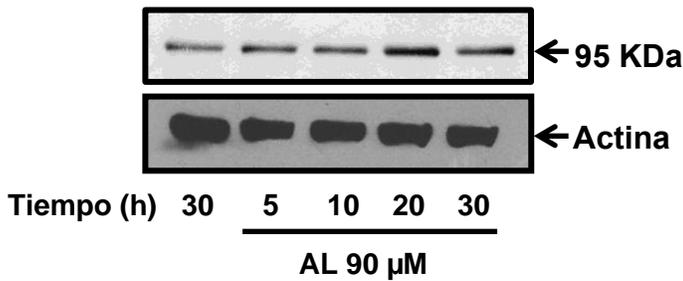
La resistencia a la insulina es una condición patológica caracterizada por una desregulación en la señalización de la insulina en la sangre. La resistencia a la insulina es uno de los componentes recurrentes en patologías como síndrome metabólico, obesidad, DMT2 y cáncer [97]. Tanto el IR como el IGF-1R se han encontrado sobreexpresados en algunas células cancerosas, proponiéndose a ambos receptores como piezas clave en la promoción y desarrollo de cáncer vía el incremento de los niveles de insulina [42, 98]. Por tal motivo, se decidió evaluar si el AL induce un incremento en la expresión del IR e IGF-1R, para lo cual, células MDA-MB-231 y MCF7 fueron tratadas a diferentes tiempos con 90  $\mu$ M de AL y posteriormente lisadas; los lisados celulares resultantes fueron analizados mediante Western blot con un anticuerpo específico anti-IR $\beta$  o bien anti-IGF-1R $\beta$ . Como se muestra en la figura 5, el tratamiento de las células con AL indujo un aumento en la expresión del IR (Figura 5A, panel superior) y del IGF-1R (Figura 5B, panel superior) llegando a un máximo a las 20 y 30 h respectivamente en células MDA-MB-231, mientras que en los cultivos celulares MCF7 el incremento sólo se presentó en la expresión del IR (Figura 5C, panel superior). Posteriormente, se determinó si el tratamiento con AL induce un incremento en la expresión de los receptores IR e IGF-1R en una línea celular epitelial no tumorigénica MCF12A. En contraste, el AL no indujo incremento alguno en la expresión de dichos receptores en células epiteliales mamarias no tumorigénicas MCF12A (Figura 5E-F, panel superior). Se utilizaron anticuerpos anti-actina como controles de carga (Figuras 5A-F, panel inferior).

Para corroborar estos resultados, células MDA-MB-231 fueron cultivadas en cubreobjetos y pretratadas o no con 90  $\mu$ M de AL por 20 horas. Posteriormente, las células fueron lavadas y estimuladas o no con 340 nM de insulina durante 24 h. Los cultivos fueron fijados y teñidos para inmunofluorescencia usando los

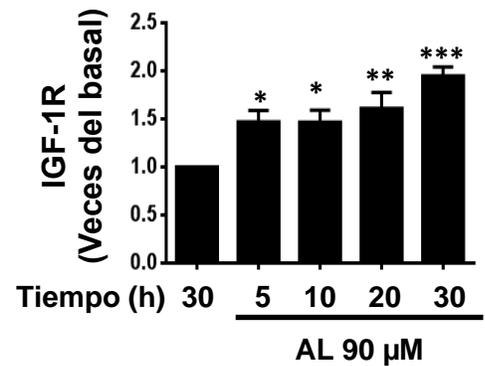
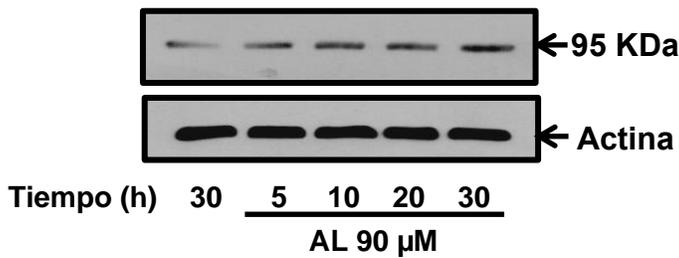
anticuerpos anti-IR $\beta$ , anti-IGF-1R $\beta$  y faloidina rodaminada para la detección de actina. Como se muestra en la figura 6A-B el tratamiento con insulina no induce un incremento en la expresión de IR e IGF-1R; sin embargo, el pretratamiento con AL y la posterior estimulación con insulina induce un incremento en la expresión de estos receptores (IR, IGF-1R).

### MDA-MB-231

#### A) IR BLOT

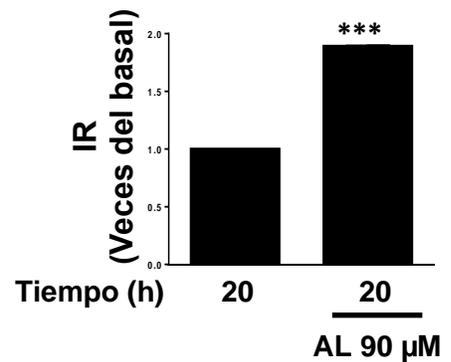
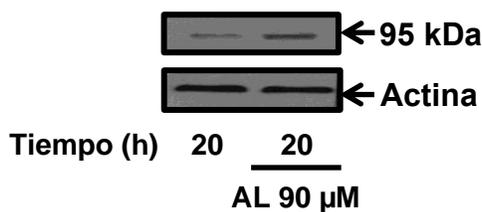


#### B) IGF-1R BLOT

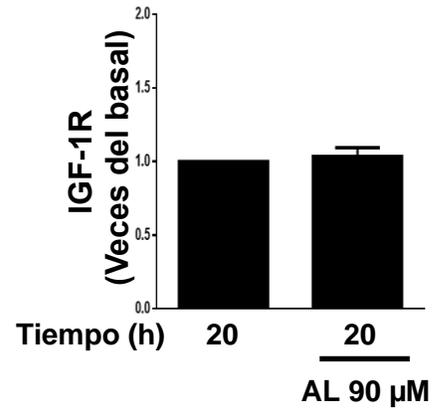
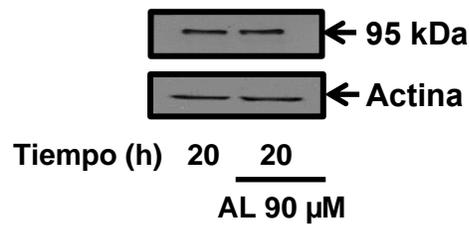


### MCF7

#### C) IR BLOT

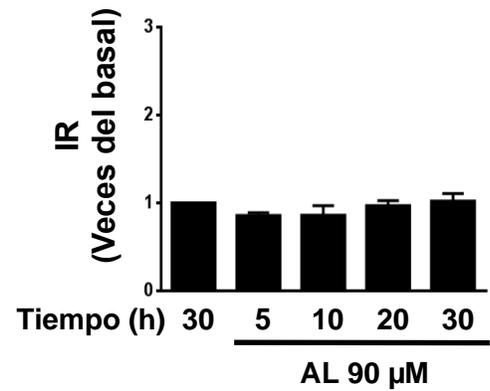
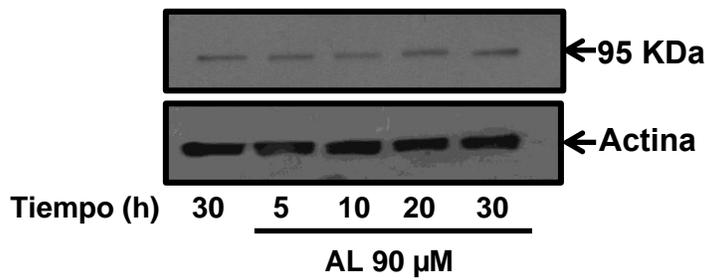


**D) IGF1R BLOT**

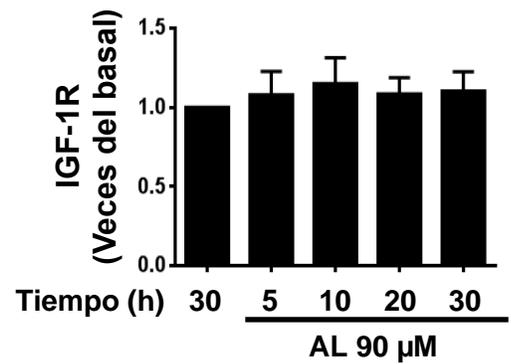
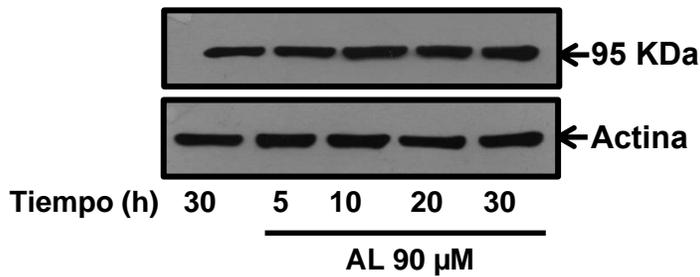


**MCF12A**

**E) IR BLOT**



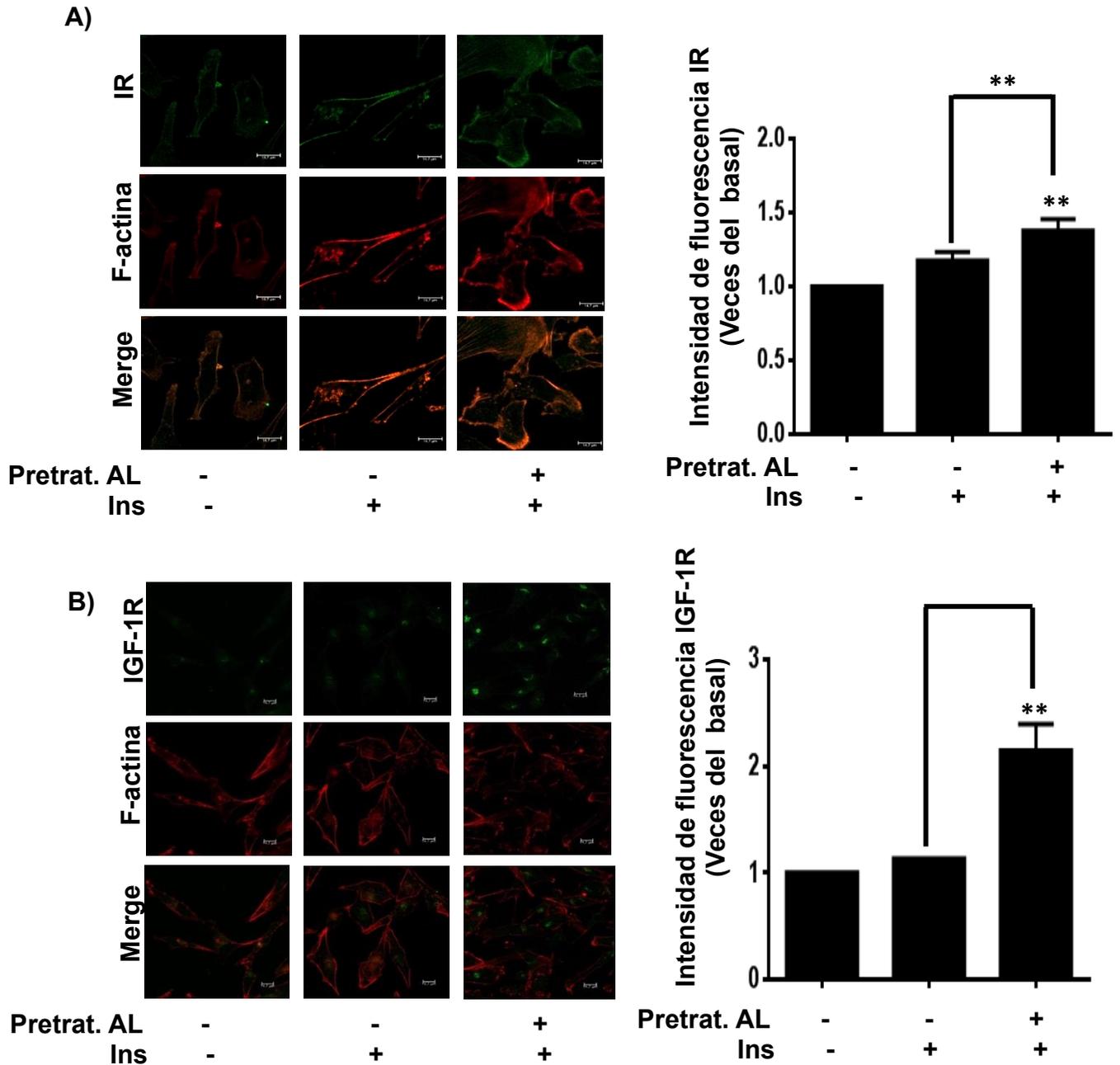
**F) IGF-1R BLOT**



**Figura 5.** El AL induce un aumento en la expresión del IR e IGF-1R en células de cáncer de mama. Células MDA-MB-231 (Panel A y B), células MCF7 (Panel C y D) y células MCF12A (Panel E y F) fueron tratadas con 90  $\mu$ M de AL a diferentes tiempos y lisadas. Los lisados fueron analizados por Western blot con anticuerpo anti-IR $\beta$  y anticuerpo anti-IGF-1R $\beta$ . Se utilizó

anticuerpo anti-actina como control de carga. Los gráficos representan la media  $\pm$  desviación estándar (D. E.) y son expresados como las veces de aumento en IR e IGF-1R por encima de los valores de las células sin estimular. Los asteriscos denotan las comparaciones hechas con las células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

### MDA-MB-231



**Figura 6.** AL promueve un incremento en la expresión de IR e IGF-1R inducida por insulina en células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 fueron pretratadas o no con AL 90  $\mu$ M por 20 horas.

Los cultivos fueron lavados y estimulados (+) o no estimulados (-) con 340 nM de insulina durante 24 horas. Las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-IR $\beta$  (Panel A) o anti-IGF-1R $\beta$  (Panel B) conjugado a FITC. Actina fue teñida con faloidina rodaminada. Las imágenes fueron obtenidas por medio de microscopía confocal. IR e IGF-1R se muestran en verde, mientras que las estructuras de F-actina se observan en rojo. Las gráficas representan la intensidad media de fluorescencia de tres experimentos independientes y son expresados con respecto a las células que no recibieron ningún tratamiento. Los asteriscos denotan las comparaciones hechas con las células no estimuladas, así como con células pretratadas o no con AL y estimuladas con insulina. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

## **VIII.2 El AL induce un incremento en la expresión de IR e IGF-1R a través de una vía dependiente de FFAR4**

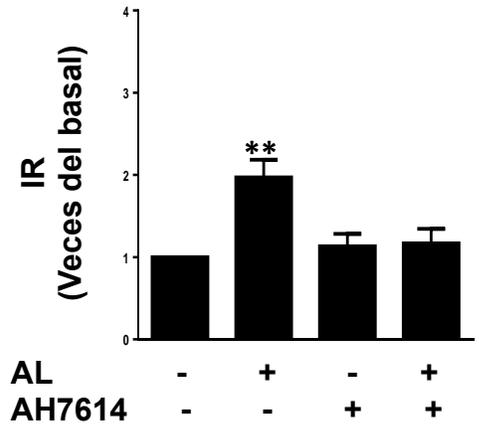
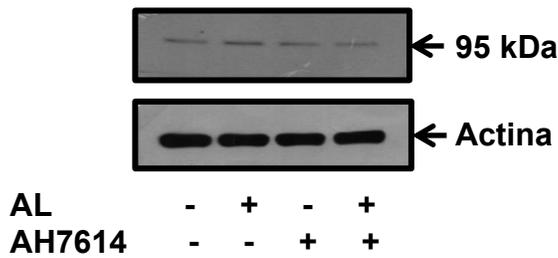
Debido a que FFAR es activado por ácidos grasos libres, como el AL [51], se decidió analizar si FFAR4 regula el incremento de la expresión de IR e IGF-1R inducida por el pretratamiento con AL. Para lo cual cultivos celulares de MDA-MB-231 fueron tratados con AH7614 20  $\mu$ M, el cual es un inhibidor selectivo de FFAR4 [99], y posteriormente fueron estimulados con AL 90  $\mu$ M durante 20 h. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron lisadas y la expresión de los receptores fue analizada mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-IR y anti-IGF-1R. Como se ilustra en la figura 7 A y B, el AL induce un incremento de la expresión de IR e IGF-1R a través de una vía de señalización dependiente de FFAR4 en células de cancer mamario MDA-MB-231.

Por otra parte, estudios previos en nuestro laboratorio han establecido que el AL induce la activación de Src, así como también un proceso de migración a través de LOXs y una vía dependiente de Src en células MDA-MB-231 [100]. Debido a esto, se decidió analizar el papel de LOXs y Src en el incremento de la expresión de IR e IGF-1R inducida por AL. Para lo cual, cultivos de células MDA-MB-231 fueron tratadas con NDGA o PP2 10  $\mu$ M, los cuales son inhibidores selectivos de la actividad de LOXs y Src, posteriormente las células fueron estimuladas con AL 90  $\mu$ M durante 20 h. La expresión de los receptores fue analizada mediante el Western blot de los lisados celulares utilizando anticuerpos anti-IR y anti-IGF-1R. Los resultados muestran que el AL induce un incremento de

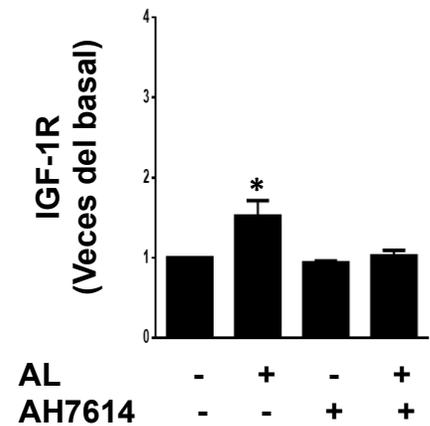
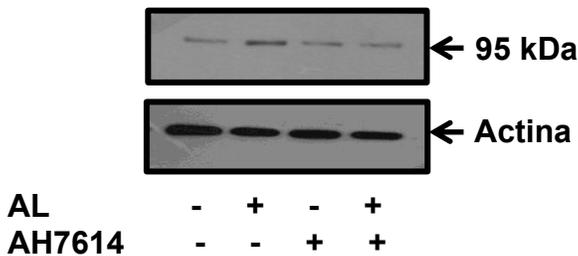
la expresión de IR e IGF-1R a través de una vía de señalización dependiente de LOXs y Src en células de cáncer mamario MDA-MB-231 (Figura 7C y D).

### MDA-MB-231

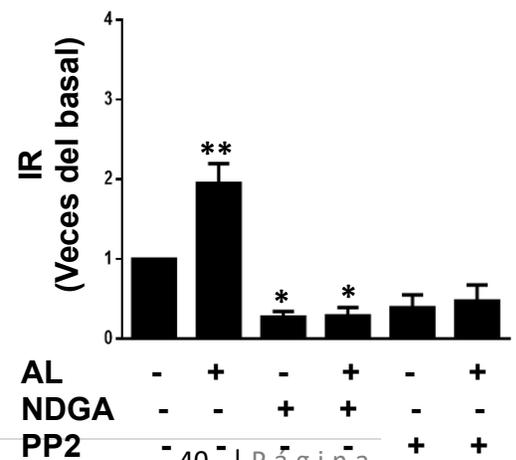
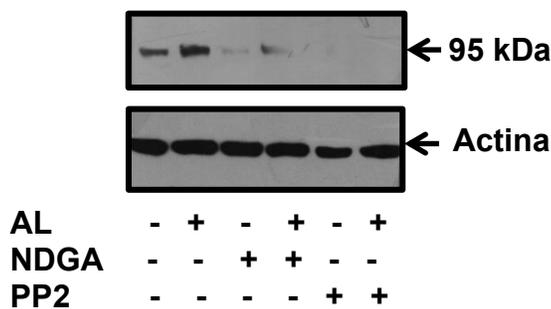
#### A) IR BLOT



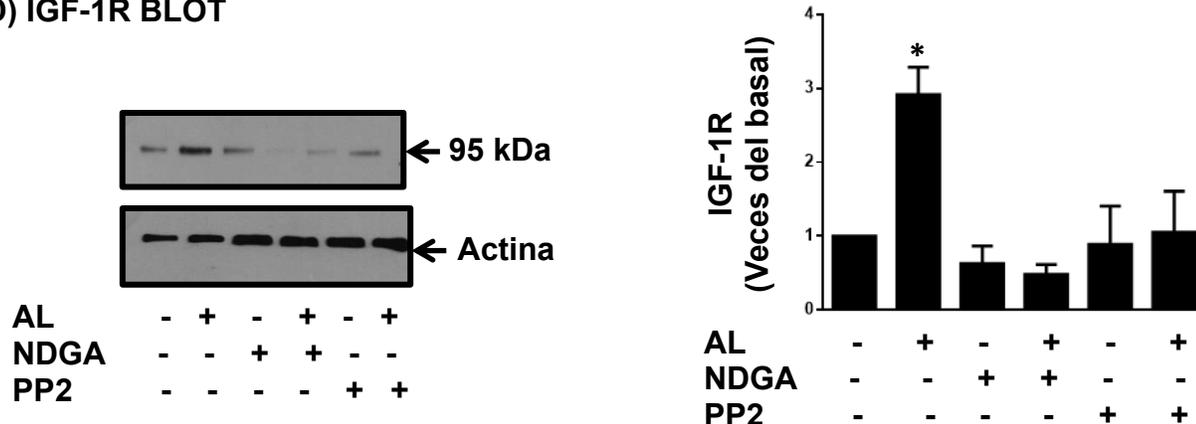
#### B) IGF-1R BLOT



#### C) IR BLOT



#### D) IGF-1R BLOT



**Figura 7.** El AL induce un incremento en la expresión del IR e IGF-1R a través de FFAR4, en una vía dependiente de LOXs y Src en células MDA-MB-231. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron (+) o no (-) tratados con AH7614 20  $\mu$ M (Panel A y B), NDGA 10  $\mu$ M y PP2 10  $\mu$ M (Panel C y D) y tratadas con AL 90  $\mu$ M durante 20 h y lisadas. Los lisados fueron analizados por medio de Western blot con anticuerpos anti-IR y anti-IGF-1R. Anticuerpo anti-actina fue utilizado como control de carga. Las gráficas son la media  $\pm$  desviación estándar (D. E.) y son expresados como las veces de aumento en IR e IGF-1R por encima de los valores del control. Los asteriscos denotan las comparaciones hechas con las células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

### VIII.3 El AL promueve un incremento en la migración celular inducida por la insulina en células MDA-MB-231

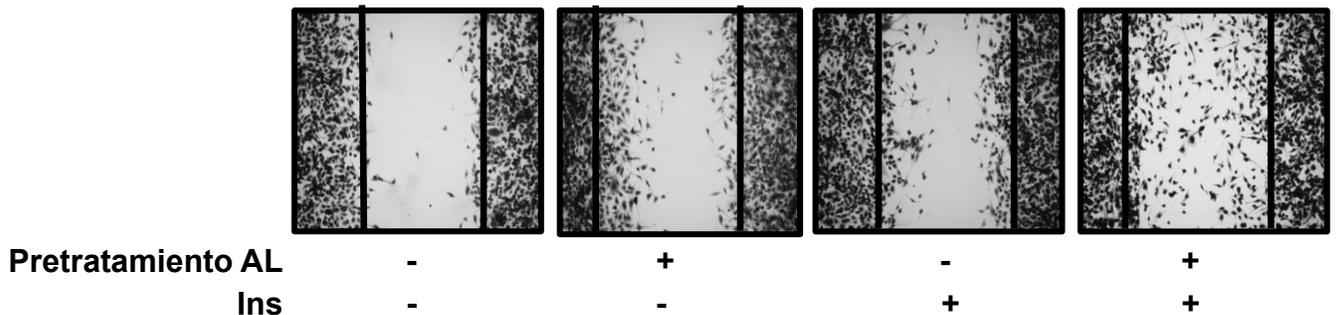
Previamente, se ha demostrado que el AL promueve migración celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231 [100]. Por ello se determinó si un pretratamiento con AL era capaz de inducir migración en células tratadas posteriormente con un estímulo de insulina. Basándose en lo anterior, células MDA-MB-231 fueron cultivadas hasta alcanzar un 100% de confluencia y después tratadas con 40  $\mu$ M de mitomicina C durante 2 h. A los cultivos celulares se les realizó una rayadura con la punta estéril de una pipeta automática de 200  $\mu$ l y posteriormente fueron pretratados con AL 90  $\mu$ M durante 20 h. Transcurrido este tiempo se procedió a estimularlos con insulina 340 nM durante 24 horas más.

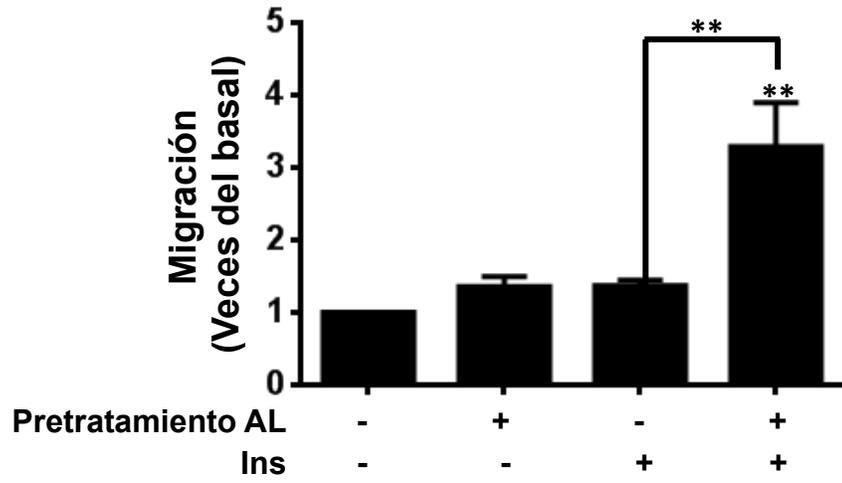
Como se muestra en la figura 8, las células pretratadas con AL y posteriormente estimuladas con insulina mostraron un aumento significativo en su patrón migratorio hacia el centro de la herida en comparación con las células que únicamente recibieron el pretratamiento con AL o sólo fueron estimuladas con insulina (Panel A). Para corroborar los resultados se llevó a cabo un ensayo de migración en cámara de Boyden bajo las mismas condiciones. Como podemos observar, de acuerdo a los resultados previos, la insulina induce una migración mayor en las células pretratadas con AL que en las células que no recibieron dicho pretratamiento (Figura 8B).

Posteriormente, se analizó si la insulina promueve incremento en la migración en otra línea celular de cáncer mamario al recibir el pretratamiento con AL. De esta manera, cultivos de células MCF7 fueron tratados con mitomicina C, lavados y pretratados con AL 90  $\mu$ M durante 20 h. En seguida, fueron estimulados con insulina 340 nM por 24 horas. Como se aprecia en la figura 8C la insulina promueve una migración mayor en los cultivos de células MCF7 pretratados con AL en comparación con aquellos que no recibieron dicho tratamiento.

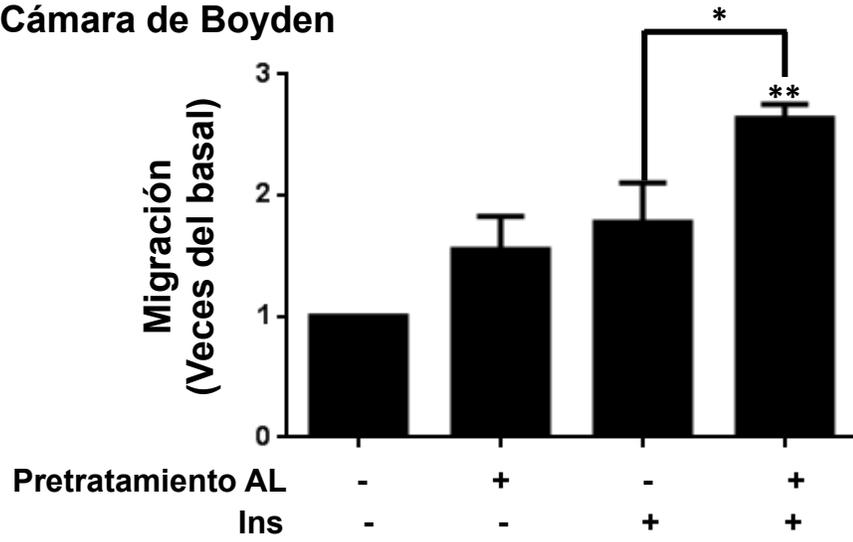
## MDA-MB-231

### A) Cierre de herida



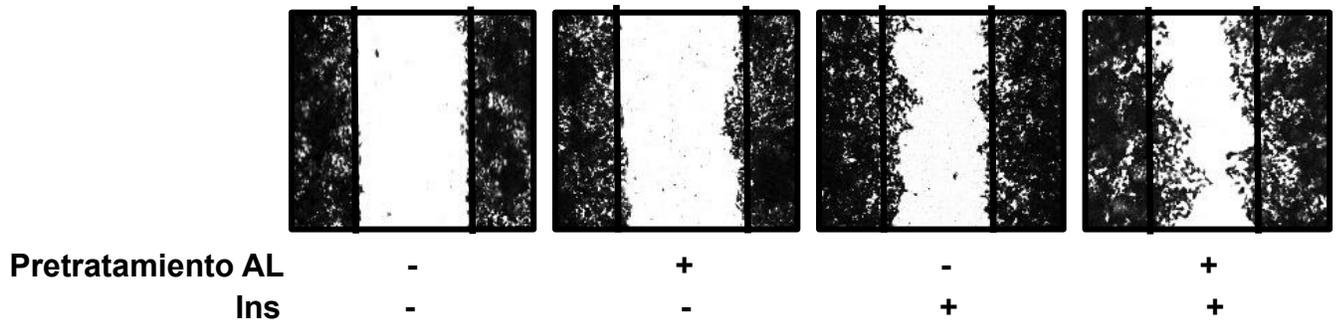


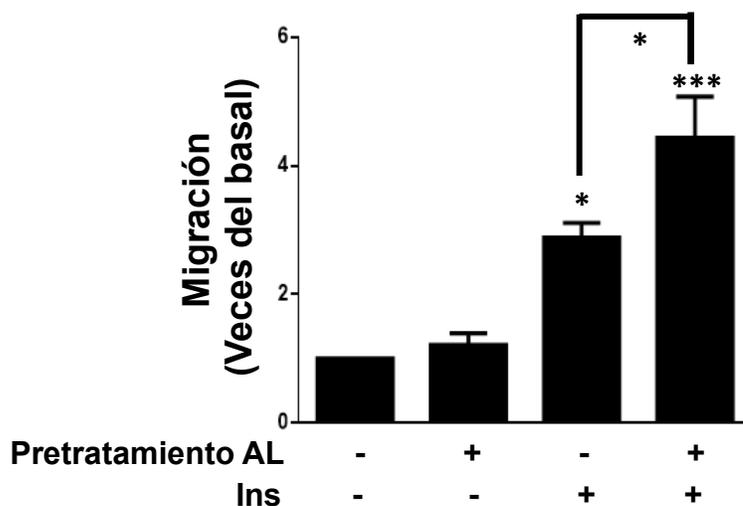
**B) Cámara de Boyden**



**MCF7**

**C) Cierre de herida**





**Figura 8.** El pretratamiento con AL promueve un incremento en la migración inducida por insulina. Panel A. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron rayados con la punta de una pipeta estéril y pretratados con 90  $\mu$ M de AL por 20 h. Los cultivos fueron lavados y estimulados (+) o no estimulados (-) con 340 nM de insulina durante 24 h. Panel B. Se realizaron ensayos de migración en cámara de Boyden donde células MDA-MB-231 fueron pretratadas con 90  $\mu$ M de AL por 20 h. Los cultivos fueron lavados y estimulados (+) o no (-) con 340 nM de insulina durante 24 h. Panel C. Cultivos confluentes de células MCF7 fueron rayados con la punta de una pipeta estéril y pretratados con 90  $\mu$ M de AL por 20 h. Los cultivos fueron lavados y estimulados (+) o no (-) con 340 nM de insulina durante 24 h. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar (D. E.) de migración de tres experimentos independientes y son expresados con respecto a las células que no recibieron ningún tratamiento. Los asteriscos denotan las comparaciones hechas con las células no estimuladas, así como con células pretratadas o no con AL y estimuladas con insulina. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

#### VIII.4 El pretratamiento con AL incrementa la secreción de MMP-9, invasión y proliferación celular inducidos por insulina en células MDA-MB-231

Debido a que se ha relacionado la participación de la insulina en procesos de proliferación y migración en cáncer de mama [101] se analizó la participación del AL en estos procesos celulares. Por lo tanto, se evaluó si el AL promueve un incremento en la secreción de MMP-2 y MMP-9 inducida por insulina. Cultivos de

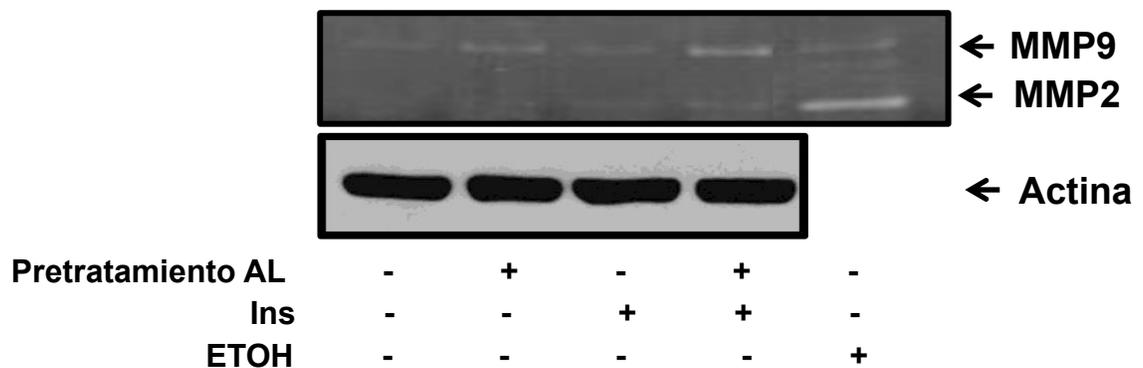
células MDA-MB-231 fueron pretratados o no con 90  $\mu$ M de AL durante 20 horas, posteriormente los cultivos celulares fueron lavados y tratados con 340 nM de insulina por 24 h. Posteriormente, los medios condicionados fueron recolectados para ser sometidos a una zimografía en gelatina. Por otro lado, las células fueron lisadas y volúmenes iguales de lisado fueron analizados por Western blot con un anticuerpo anti-actina para confirmar el mismo número de células usado en cada condición experimental.

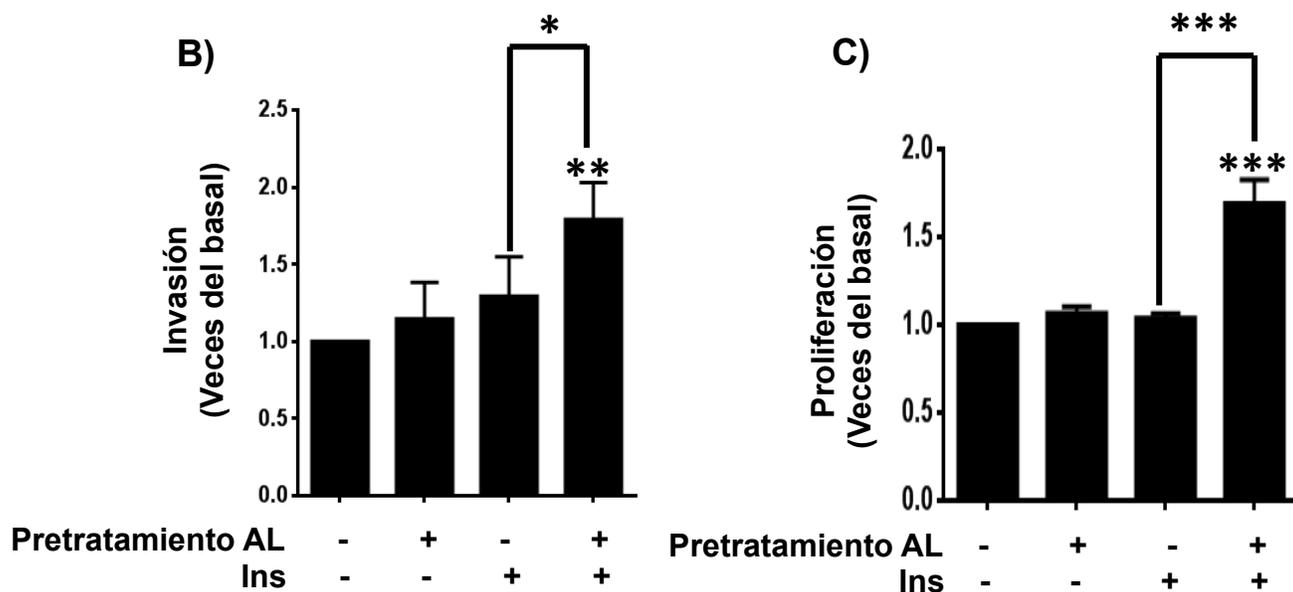
Como se muestra en la figura 9A, el pretratamiento con AL indujo un incremento en la secreción de MMP-9 de forma dependiente del tiempo. En contraste, el pretratamiento con AL no indujo incremento en la secreción de MMP-2.

Posteriormente, se analizó la capacidad de las células pretratadas con AL y estimuladas con insulina para inducir invasión celular utilizando el método de cámara de Boyden, así como también se estudió el proceso de proliferación mediado por AL en células estimuladas con insulina. En ambos casos, cultivos de células MDA-MB-231 fueron pretratadas o no con 90  $\mu$ M de AL durante 20 h. Posteriormente, los cultivos celulares fueron lavados y tratados con 340 nM de insulina por 24 horas. Los resultados muestran que las células pretratadas con AL muestran mayor invasión y proliferación celular inducida por insulina que las células que no fueron sometidas al pretratamiento con AL (Figura 9B-C).

### MDA-MB-231

A)





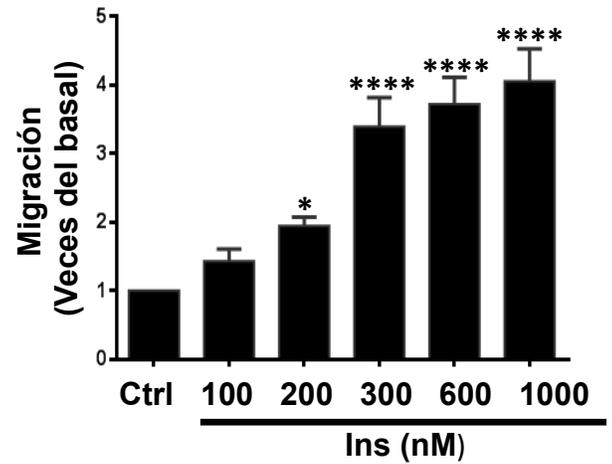
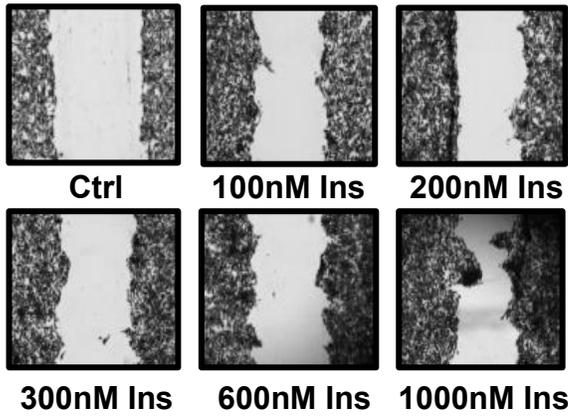
**Figura 9.** AL incrementa la invasión y proliferación celular inducida por insulina. Panel A. Células MDA-MB-231 fueron pretratadas o no con 90  $\mu$ M de AL durante 20 horas, posteriormente fueron estimuladas o no con 340 nM de insulina por 24 horas y el medio condicionado fue recolectado. La secreción de MMP-2 y MMP-9 fue analizada utilizando geles de poliacrilamida 8% co-polimerizado con gelatina como sustrato. Lisados totales fueron usados en Western blot contra un anticuerpo anti-actina como control de carga. Panel B. Células MDA-MB-231 fueron cultivadas sobre una capa de matrigel en cámaras de Boyden, enseguida fueron pretratadas con AL y/o insulina y se evaluó la invasión celular. Panel C. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron cultivadas y tratadas bajo las condiciones antes mencionadas y su capacidad de proliferación fue evaluada utilizando el reactivo WST-1, los cultivos fueron incubados y su absorbancia fue medida a 450 nm. Los gráficos representan la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de al menos tres experimentos independientes expresados en veces del basal. Las comparaciones fueron hechas con las células estimuladas así como con las células pretratadas o no con AL y estimuladas con insulina. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### **VIII.5 Insulina promueve un proceso de migración en células epiteliales no tumorales MCF10A a través de la vía del IR**

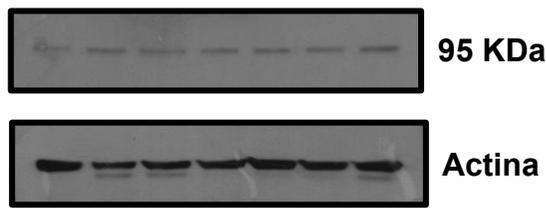
Debido a que la resistencia a la insulina se ha relacionado con patologías como el cáncer [97], se evaluó la participación de la insulina en la TEM, la cual es un mecanismo clave durante el desarrollo de la metástasis y es el proceso mediante el cual las células adquieren la capacidad de moverse [85]. Por lo cual, se analizó si la insulina induce migración. Cultivos confluentes de células MCF10A fueron utilizados en ensayos de cierre de herida. Los cultivos fueron tratados con concentraciones crecientes de insulina e incubados durante 48 horas. Los resultados indican que la insulina indujo un incremento significativo en el patrón de migración hacia el centro de la herida de una manera dependiente de la concentración, esto fue confirmado con la cuantificación del porcentaje de área cerrada en los ensayos (Figura 10A). Posteriormente, se determinó si la insulina promueve un aumento en la expresión del IR, para lo cual cultivos de células MCF10A fueron tratadas con 300 nM de insulina durante diferentes tiempos y lisadas. La expresión del IR fue analizada por Western blot con un anticuerpo anti-IR $\beta$ . Como de muestra en la figura 10B la insulina no induce un incremento en la expresión del IR en células mamarias no tumorigénicas MCF10A.

Los resultados anteriores fueron corroborados en ensayos de migración celular utilizando el método de cámara de Boyden. Para lo cual células MCF10A fueron tratadas con concentraciones crecientes de insulina. De acuerdo a los resultados previos, la insulina promueve migración de una manera dependiente de la concentración en células MCF10A (Figura 10C). Debido a que la insulina tiene la capacidad de activar al IR, IGF-1R e IR/IGF-1R, se evaluó el papel del IR en la migración celular inducida por insulina. Para este fin, se llevaron a cabo ensayos de migración en cámara de Boyden utilizando células MCF10A, las cuales fueron tratadas con HNMPA-(AM)3 200  $\mu$ M durante 2 h, el cual es un inhibidor específico del IR humano. Posteriormente, las células fueron estimuladas con insulina 300 nM durante 48 h. La figura 10D muestra que la migración inducida por la insulina en las células tratadas con HNMPA-(AM)3 es inhibida completamente.

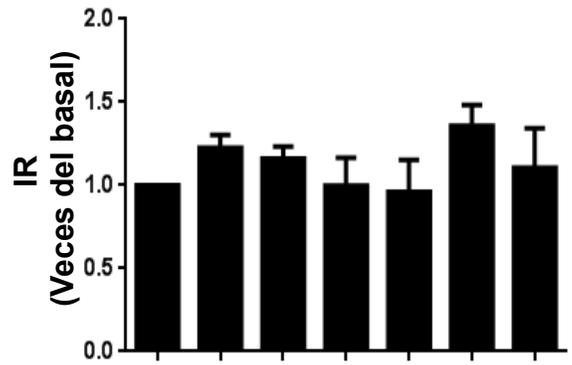
### A) Migración



### B) IR Blot

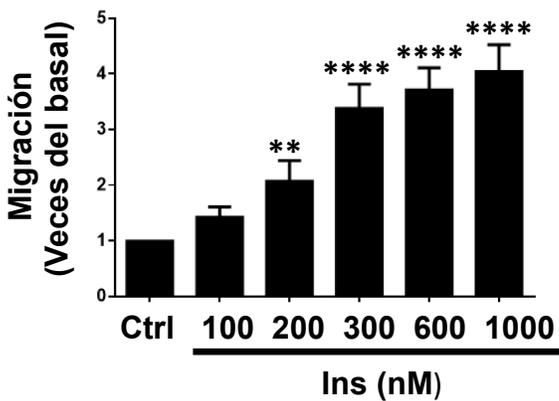


Tiempo (h) 30 3 6 9 12 24 30  
 300 nM Ins

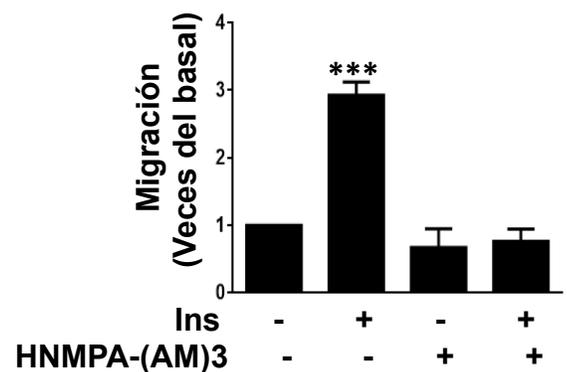


Tiempo (h) 30 3 6 9 12 24 30  
 300 nM Ins

### C)



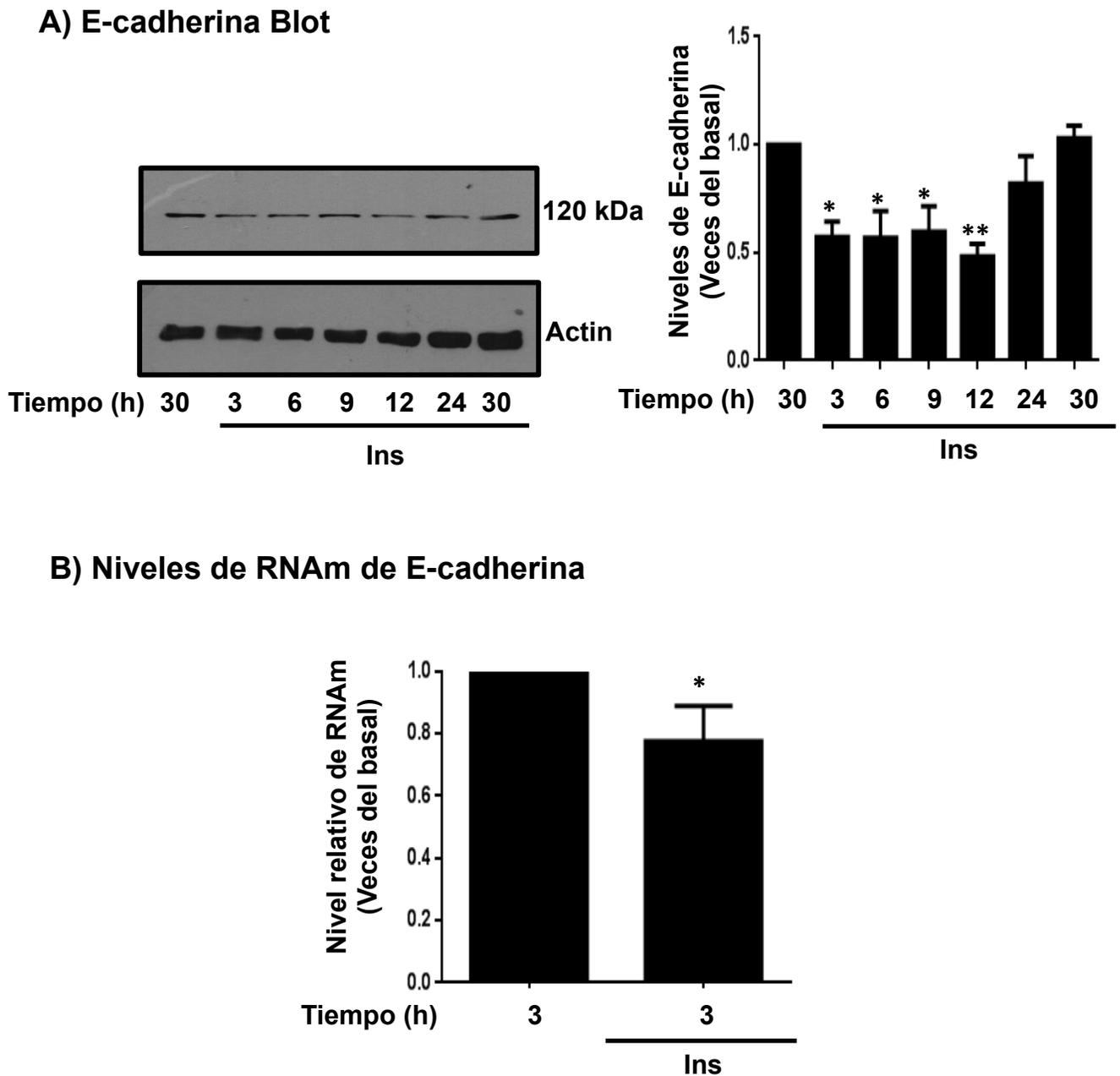
### D)



**Figura 10.** La insulina promueve migración celular mediante la señalización del IR. Panel A. Células MCF10A fueron cultivadas hasta llegar a confluencia y pretratadas con mitomicina C 12  $\mu$ M durante 2 h y estimuladas con diferentes concentraciones de insulina. Las fotografías fueron tomadas 48 horas después del tratamiento. Panel B. Células MCF10A fueron tratadas con 300 nM de insulina por diferentes tiempos y lisadas. Los lisados fueron analizados mediante Western blot con un anticuerpo anti-IR $\beta$  y anti-actina como control de carga. Panel C. Se llevaron a cabo ensayos de migración en cámara de Boyden utilizando células MCF10A estimuladas con diferentes concentraciones de insulina. Panel D. Células MCF10A fueron tratadas con (+) o sin (-) HNMPA-(AM)3 200  $\mu$ M durante 2 h y el ensayo de migración en cámara de Boyden fue llevado a cabo estimulando a las células con insulina 300 nM durante 48 h. Los gráficos representan la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de al menos tres experimentos independientes expresados en veces del basal. Las comparaciones fueron hechas con las células control (no estimuladas). \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P<0.0001.

### **VIII.6 Insulina induce disminución de los niveles de expresión de E-cadherina**

La TEM involucra la pérdida de E-cadherina [102], por lo se determine si la insulina induce disminución en la expresión de E-cadherina. Cultivos de células MCF10A fueron tratados con 300 nM de insulina por varios tiempos y lisados. Los lisados fueron analizados mediante Western blot usando anticuerpos anti-E-cadherina y anti-actina como control de carga. Como se observa en la figura 11A (panel superior) el tratamiento con insulina indujo una disminución en la expresión de E-cadherina durante las 3, 6, 9 y 12 horas, recuperándose a las 24 horas de estímulo. A continuación, se evaluó si el tratamiento con insulina presentaba algún efecto sobre la expresión del RNAm de E-cadherina. Para lo cual, células MCF10A fueron tratadas con 300 nM de insulina por 3 horas, el RNA total fue obtenido y los transcritos de E-cadherina fueron analizados RT-qPCR en tiempo-real. Los resultados indican que la insulina promueve la disminución de los transcritos de E-cadherina a las 3 horas, tal y como se observa en la figura 11B.



**Figura 11.** Insulina promueve disminución transitoria de la expresión de E-cadherina. Panel A. Células MCF10A fueron tratadas con 300 nM de insulina por diferentes tiempos y lisadas. Los lisados fueron analizados mediante Western blot con un anticuerpo anti-E-cadherina y anti-actina como control de carga. La gráfica de densitometría representa la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes. Panel B. Cultivos de MCF10A tratados con 300 nM de insulina durante 3 horas fueron sometidos a extracción de RNA total. Se cuantificó RNAm de E-cadherina mediante PCR en tiempo-real. . \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

### **VIII.7 Insulina promueve la activación de FAK y el incremento en la expresión de N-cadherina y vimentina**

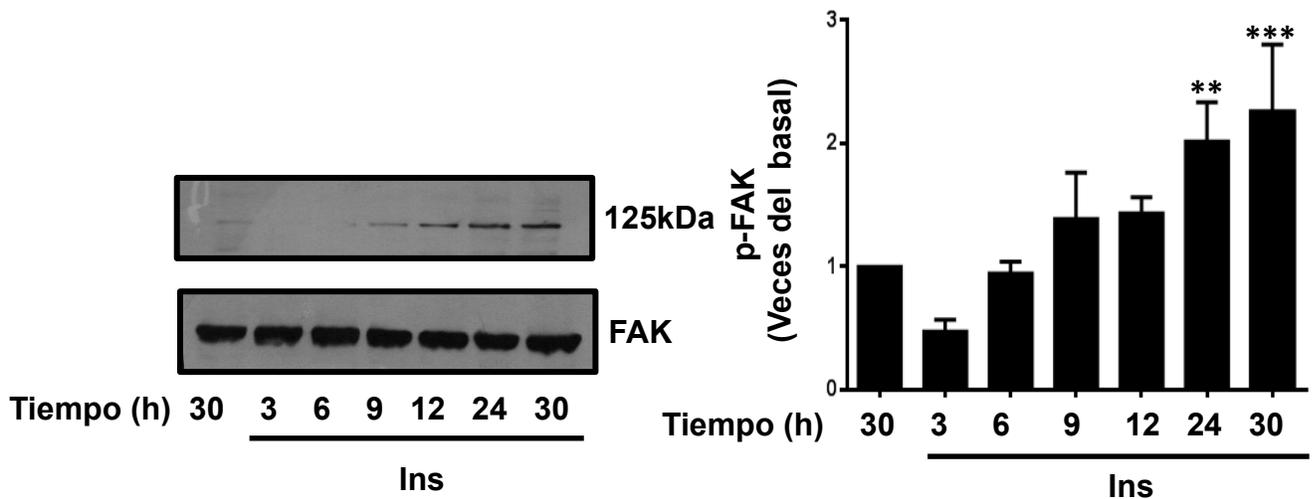
FAK es un mediador de la migración celular por lo tanto juega un papel importante en el proceso de TEM [93]. Por lo que se analizó si la insulina induce la activación de FAK dada por la fosforilación en su Tyr-397. Las células MCF10A fueron estimuladas con 300 nM de insulina por diferentes tiempos y lisadas. Los lisados fueron analizados por Western blot con un anticuerpo anti-p-FAK<sup>397</sup>. Los resultados muestran que la insulina induce un incremento en la fosforilación de FAK en la Tyr-397 (activación) de una forma dependiente del tiempo (Figura 12A).

Por otra parte, la represión de la transcripción de E-cadherina está acompañada por la inducción de N-cadherina, a este evento se le denomina switch de cadherinas y se propone que contribuye en la progresión del cáncer [103, 104]. La expresión de filamentos intermedios también se ve afectada durante la TEM, como es el caso de la vimentina [88]. Dado lo anterior se determinó si el tratamiento con insulina induce un incremento en la expresión de N-cadherina y vimentina. Para este fin, cultivos de células MCF10A fueron tratados con 300 nM de insulina por diferentes tiempos, las células fueron lisadas y analizadas mediante Western blot usando anticuerpos anti-N-cadherina, anti-vimentina y anti-actina como control de carga. Los resultados obtenidos demostraron que la insulina induce la expresión de N-cadherina y vimentina como es observado en la figura 12B y 13A respectivamente.

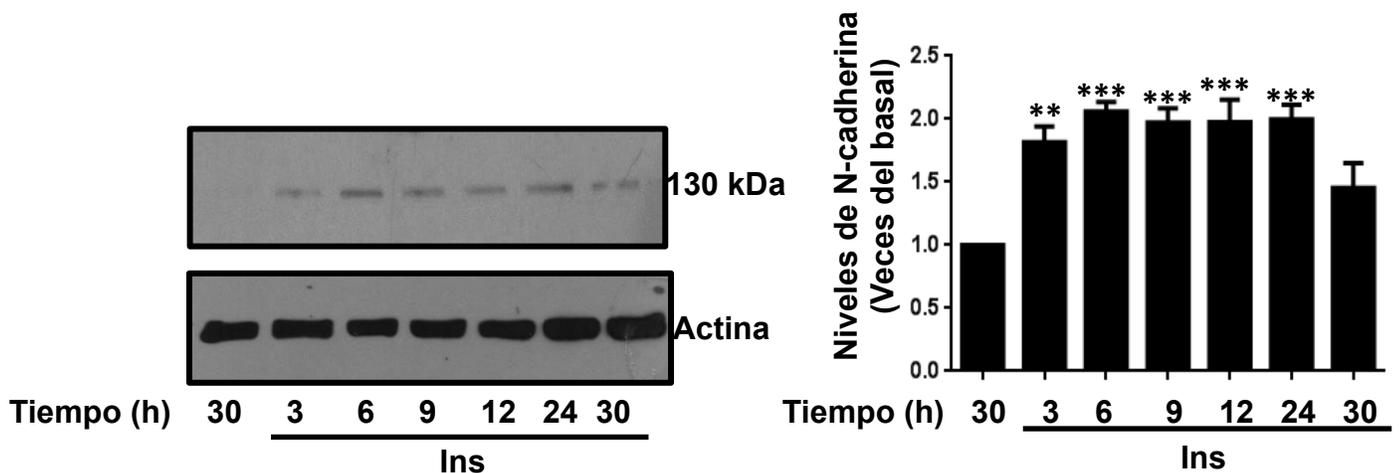
Para corroborar los resultados anteriores, se evaluó el patrón de expresión de vimentina en células MCF10A tratadas con insulina mediante microscopía confocal. Cultivos de celulares MCF10A fueron usados en ensayos de migración de cierre de herida, tratados con insulina durante 48 horas y manipulados para microscopía confocal. Las células fueron permeabilizadas e incubadas con anticuerpo anti-vimentina (verde) y la F-actina fue teñida con faloidina rodaminada (rojo). Como es observado en la figura 13B, las células sin tratamiento presentan una expresión basal de vimentina, sin embargo, las células tratadas con insulina presentaron un notable incremento en la expresión de la misma.

Posteriormente se determinó el papel del IR en la expresión de vimentina inducida por la insulina. Células MCF10A fueron tratadas con HNMPA-(AM)3 200  $\mu$ M durante 2 h y estimuladas con insulina 300 nM por 6 h y lisadas. Los lisados fueron analizados mediante Western blot con anticuerpos anti-vimentina y anti-actina. Los resultados demostraron que el tratamiento con el inhibidor de IR (HNMPA-(AM)3) abatió completamente la expresión de vimentina inducida por la insulina (Figura 13C).

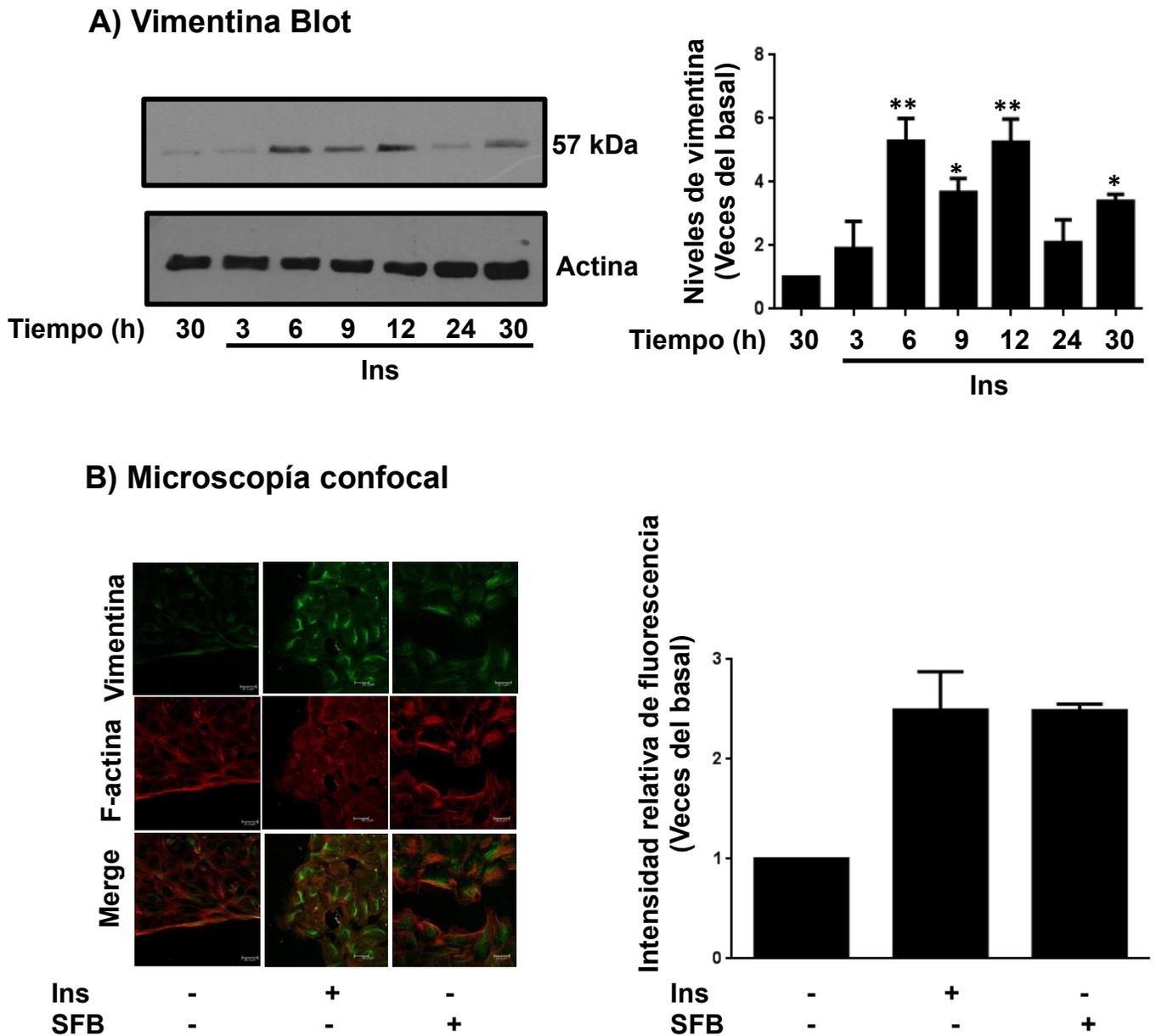
### A) p-FAK Blot

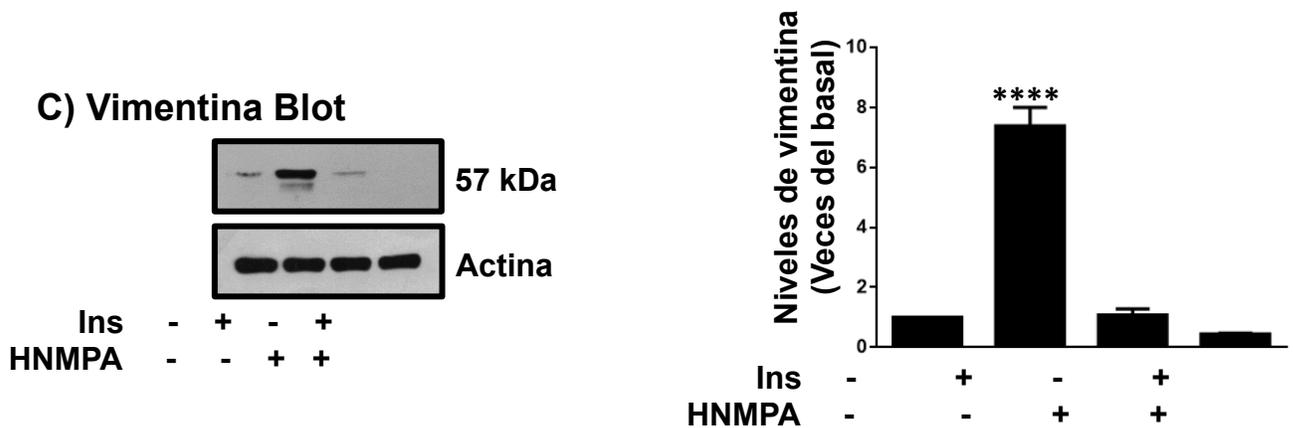


### B) N-cadherina Blot



**Figura 12.** Activación de FAK e incremento en la expresión de N-cadherina inducido por la insulina. Panel A. Células MCF10A fueron tratados con 300 nM de insulina durante diferentes tiempos y lisadas. Los lisados fueron analizados mediante Western blot y revelados con un anticuerpo anti-FAK-Tyr(P)<sup>397</sup> y anti-actina como control de carga. Panel B. Células MCF10A fueron estimuladas con 300 nM de insulina durante diferentes tiempos y lisadas. Los lisados fueron analizados mediante Western blot con un anticuerpo anti-N-cadherina y anti-actina como control de carga. Las gráficas de densitometría representan la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.





**Figura 13.** Incremento en la expresión de vimentina inducido por insulina mediado por la señalización del IR. Panel A. Cultivos de células MCF10A fueron tratados con 300 nM de insulina durante diferentes tiempos y lisados. Los lisados se analizaron mediante Western blot y revelados con anticuerpo anti-N-vimentina y anti-actina como control de carga. La gráfica de densitometría representa la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Panel B. Células MCF10A fueron crecidas en cajas de 35 mm y pretratados con mitomicina C durante 2 horas, posteriormente se hizo una rayadura con la punta estéril de una pipeta de 200  $\mu$ l y tratadas con 300 nM de insulina durante 48 horas. Los cultivos fueron fijados para inmunofluorescencia con anticuerpo anti-vimentina (verde) y F-actina (rojo) y analizados mediante microscopía confocal. La gráfica de densitometría representa la intensidad relativa de fluorescencia de tres experimentos independientes. \*\* $P < 0.01$ . Panel C. Células MCF10A fueron tratadas (+) o no (-) con HNMPA-(AM)3 durante 2h y estimuladas con insulina en las 6 h posteriores. Las células fueron lisadas, los lisados fueron analizados mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-N-vimentina y anti-actina. La gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes. \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

### VIII.8 Insulina promueve un aumento en la activación de NF $\kappa$ B

Se ha destacado la participación de factores de transcripción durante el proceso de TEM, como es el caso de NF $\kappa$ B, que se encuentra regulando la expresión de proteínas involucradas en dicho proceso celular promoviendo la activación de represores transcripcionales de E-cadherina [94]. Por lo que, empleando la técnica de ensayo del cambio de movilidad electroforética (EMSA), se analizó el papel de NF $\kappa$ B en el proceso de TEM inducido por insulina. Los EMSA fueron realizados con extractos nucleares provenientes

de células MCF10A estimuladas con 300 nM de insulina durante diferentes tiempos, los cuales fueron incubados con una sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  que contenía sitios consenso canónicos de unión a NF $\kappa$ B. Como se puede apreciar en la figura 14A, el tratamiento con insulina indujo la activación de NF $\kappa$ B de manera dependiente del tiempo.

Enseguida, se determinó si la insulina induce la formación de complejos DNA-proteína entre extractos nucleares de células MCF10A y secuencias consenso correspondientes a las cajas-E (E-box). Utilizando la técnica de EMSA se determinó si el tratamiento con insulina induce la formación de complejos en las cajas-E, usando extractos nucleares derivados de células MCF10A estimuladas con 300 nM de insulina y una sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  que contenía una secuencia consenso canónica de unión con E-box. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con insulina indujo un incremento en la formación de complejos DNA-proteína entre las proteínas contenidas en el extracto nuclear y cajas-E. La máxima formación de complejos se presentó a las 12, 24 y 30 horas de tratamiento con insulina (Figura 14B).

Asimismo, los factores de transcripción de las familias de Snail, Twist y Zeb actúan como represores transcripcionales de E-cadherina, esto es regulado por su unión a secuencias consenso en el promotor de E-cadherina, denominadas cajas-E [105]. Por ello, se estudió el efecto del tratamiento con insulina sobre la expresión de los represores transcripcionales de E-cadherina. Células MCF10A fueron tratadas con 300 nM de insulina durante diferentes tiempos, se obtuvo el RNA total y se analizó mediante RT-qPCR. Como es observado en la figura 14C, el tratamiento con insulina durante 3 horas indujo un decremento en la expresión de los transcritos de Twist1/2 así como un incremento del transcrito ZEB1, mientras que la expresión de los transcritos Snail1/2 y Sip1 no se vio afectada.

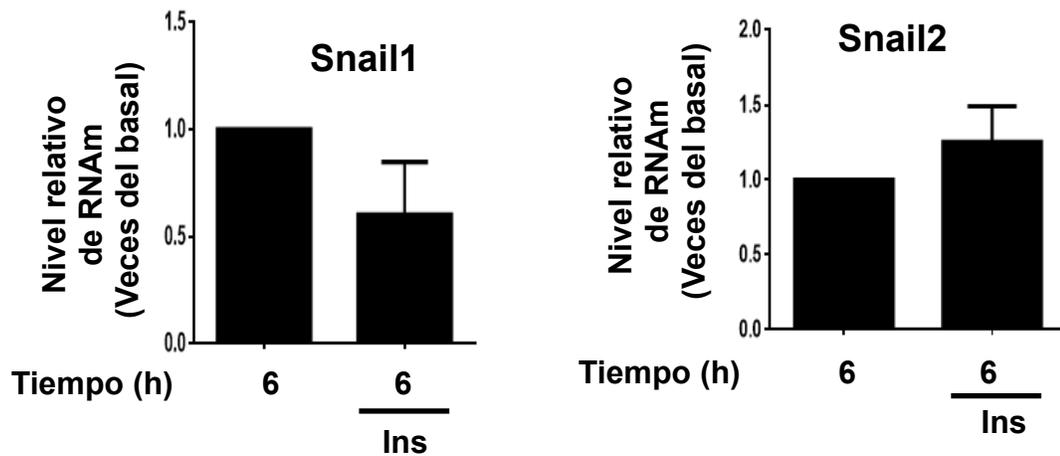
### A) EMSA NFκB

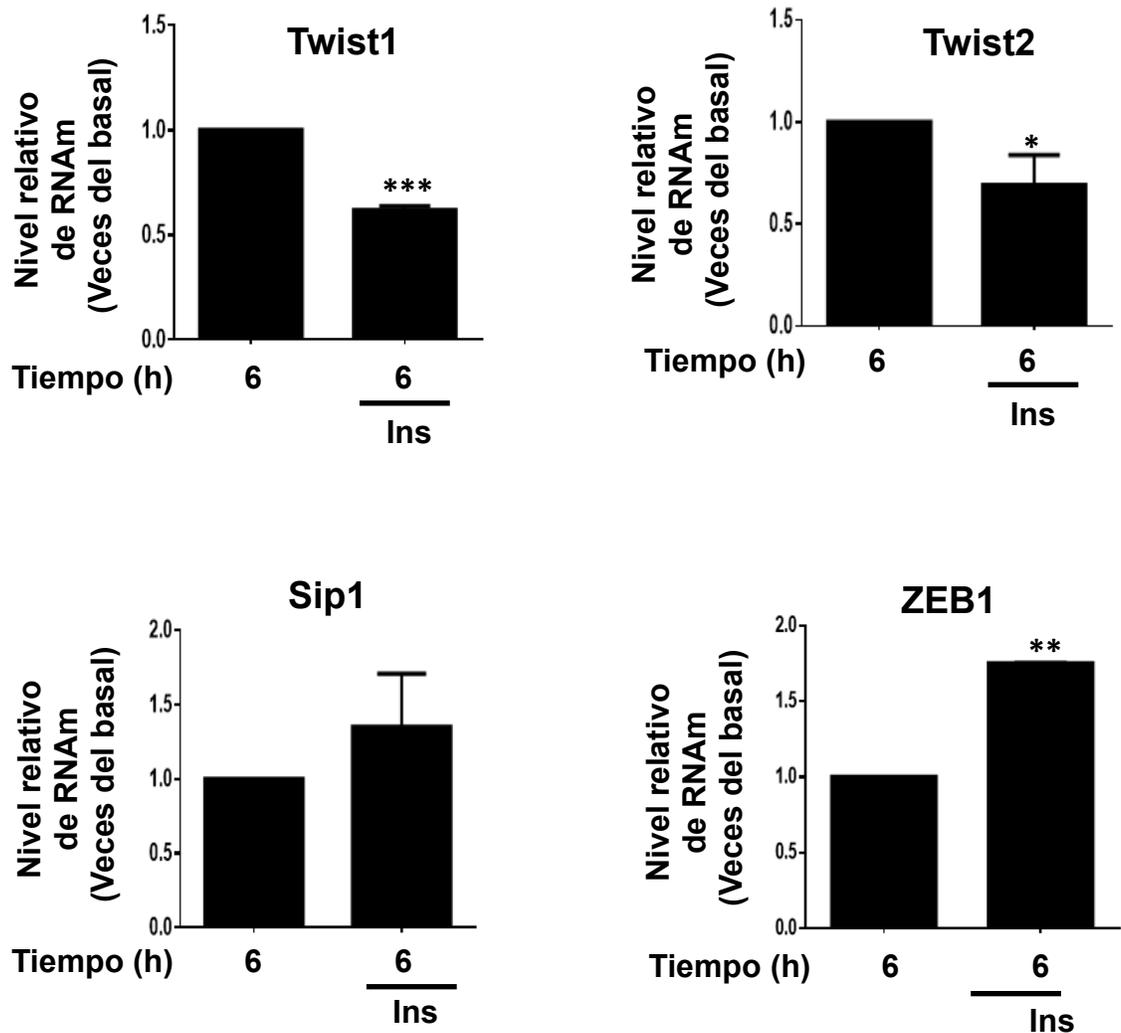


### B) EMSA E-box



### C) Niveles de RNAm





**Figura 14.** Unión de factores de transcripción a E-box y activación de NFκB promovidas por insulina. Células MCF10A se trataron con 300 nM de insulina durante diferentes tiempos y los extractos nucleares fueron obtenidos. Dichos extractos fueron incubados con un oligonucleótido marcado con o sin <sup>32</sup>P; la sonda contenía sitios canónicos de NFκB (Panel A) y cajas-E (Panel B) que se analizaron mediante EMSA. Panel C. Cultivos de células MCF10A fueron tratadas con 300 nM de insulina durante 3 horas y el RNA total fue obtenido. La expresión de RNAm de Snail1, Snail2, Twist1, Twist2, Sip1 y ZEB1 fue determinada mediante PCR en tiempo-real. Las gráficas representan la media ± desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes y están expresados respecto al basal). \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

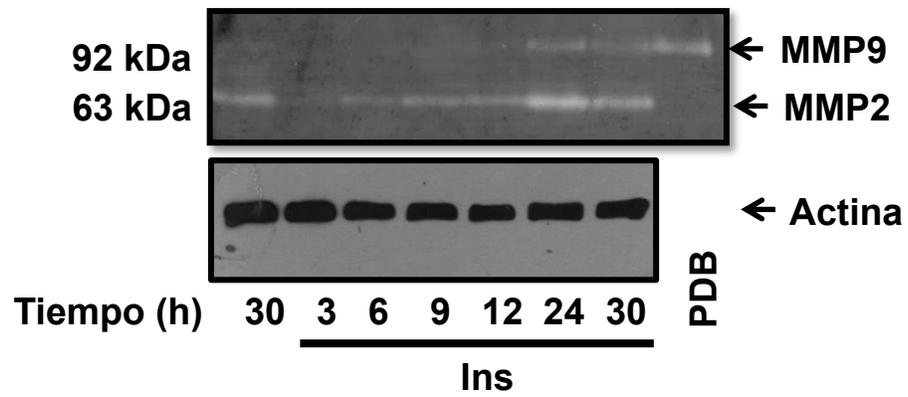
### **VIII.9 Insulina promueve invasión celular**

La TEM está caracterizada por la adquisición de marcadores mesenquimales como lo son la migración e invasión [85]. Así que se evaluó si la insulina promueve la secreción de MMP-2 y MMP-9 además de estudiar su participación en el proceso de invasión. Para ello, cultivos de células MCF10A fueron estimulados con 300 nM de insulina durante diferentes tiempos, se recuperaron los medios condicionados y los cultivos fueron lisados. Los medios condicionados fueron concentrados y utilizados para realizar zimografía en gelatina y Western blot usando anticuerpo anti-actina para confirmar que el mismo número de células fue utilizado en el tratamiento. En la figura 15A se muestra que el tratamiento con insulina indujo un incremento en la secreción tanto de MMP-2 como de MMP-9 de manera dependiente del tiempo.

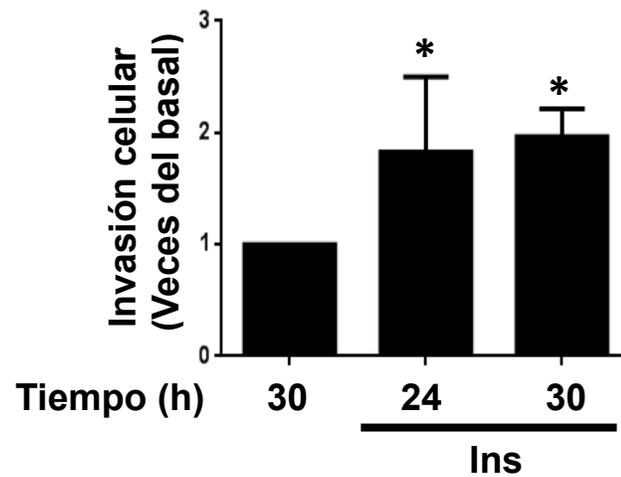
Posteriormente, se analizó la participación de la insulina en la invasión celular realizando ensayos de migración en cámara de Boyden modificadas con matrigel. Células MCF10A fueron estimuladas con 300 nM de insulina durante 24 y 30 horas. Posteriormente, los ensayos de invasión fueron realizados. Los resultados obtenidos demostraron que la insulina indujo invasión tanto a las 24 como a las 30 horas (Figura 15B).

Una vez determinada la participación de la insulina en la invasión de células MCF10A se analizó el papel del IR en dicho proceso. Para ello, se realizaron ensayos de invasión en cámara de Boyden utilizando cultivos celulares MCF10A tratados con HNMPA-(AM)3 200  $\mu$ M durante 2 h y estimulados con insulina 300 nM por 30 h. Como es observado en la figura 15C, el tratamiento con HNMPA-(AM)3 inhibió por completo la invasión inducida por la insulina.

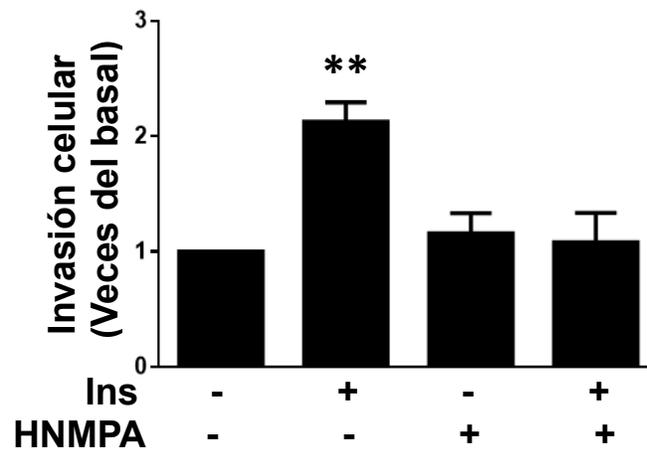
### A) Zimografía



### B) Invasión



### C) Invasión



**Figura 15. Insulina induce secreción de MMP-2 y MMP-9 e invasión celular.** Panel A. Cultivos de células MCF10A fueron tratadas con 300 nM de insulina a diferentes tiempos y se recolectaron los medios condicionados. Se analizó la secreción de MMP-2 y MMP-9 utilizando geles de poliacrilamida al 8% co-polimerizados con gelatina como sustrato y se realizó Western blot con un anticuerpo anti-actina como control de carga. Panel B. Células MCF10A fueron cultivadas y tratadas con 300 nM de insulina para posteriormente ser sometidas a un ensayo de invasión en cámara de Boyden modificada con matrigel. Panel C. Células MCF10A fueron tratadas (+) o no (-) con HNMPA-(AM)3 200  $\mu$ M durante 2 h y el ensayo de invasión fue evaluado utilizando el método en cámara de Boyden modificada con matrigel. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes expresados en veces del basal. \*P<0.05, \*\*P < 0.01.

## IX. DISCUSIÓN

En los últimos años, diversos estudios epidemiológicos y de tipo experimental han demostrado que existe una fuerte correlación entre las dietas altas en grasas y el riesgo de desarrollar enfermedades tales como obesidad y cáncer de mama [100, 106-110]. La obesidad promueve un estado de inflamación crónica en bajo grado y resistencia a la insulina la cual es definida como una falla en los niveles de la misma, que promueve su incapacidad para dirigir acciones metabólicas, lo cual es estrechamente relacionado con patologías como diabetes mellitus tipo 2, que ha sido asociada con un incremento en el riesgo de cáncer. Los mecanismos aún son investigados, sin embargo, la resistencia a la insulina, con su subsecuente hiperinsulinemia, es la hipótesis frecuentemente propuesta, puesto que la insulina podría tener un efecto mitogénico a través de la unión con sus receptores [75, 76, 111].

La obesidad es considerada un factor de riesgo para cáncer postmenopáusico y también está relacionada con la resistencia a la insulina y un incremento en el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 [112].

De manera particular se ha observado que el AL, un ácido graso poliinsaturado  $\omega$ -6 presente en los aceites vegetales, tiene la capacidad de promover adhesión, invasión, proliferación y estimula el crecimiento y metástasis de líneas celulares de cáncer de mama en ratones desnudos. Asimismo, estudios epidemiológicos han relacionado la hiperinsulinemia con un fenotipo agresivo y metastásico de cáncer mamario, así como se ha establecido que la insulina estimula la proliferación de algunas líneas celulares humanas de cáncer de mama [112]. Sin embargo, la relación entre los ácidos grasos libres y la insulina no ha sido estudiada a detalle.

En células de cáncer de mama el AL induce la activación de vías de señalización en diversos procesos celulares. Previamente, nuestro equipo de trabajo ha demostrado que el tratamiento con AL a una concentración de 90  $\mu$ M induce la activación de FAK así como la migración celular a través de una

vía dependiente de la actividad de Src, Gi/Go, COX-2 y LOX en células de cáncer de mama MDA-MB-231, mientras el tratamiento con AL a 60  $\mu\text{M}$  regula un proceso parecido a la transición epitelio-mesénquima en células epiteliales mamarias MCF10A [96, 100]. En el presente estudio se demostró que el pretratamiento de las células MDA-MB-231 con AL 90  $\mu\text{M}$  induce un incremento de la expresión de IR e IGF-1R, mientras que en las células MCF7 sólo induce la expresión del IR. Sin embargo, la estimulación con 90  $\mu\text{M}$  de AL no es capaz de inducir un incremento en la expresión de IR e IGF-1R en células MCF12A, las cuales representan células epiteliales mamarias no tumorales. Estos resultados sugieren fuertemente que el AL es capaz de inducir un incremento en la expresión de IR y/o IGF-1R únicamente en células de cáncer mamario.

En el presente trabajo se demostró que el AL induce un incremento en la expresión de IR e IGF-1R en células de cáncer de mama invasivas y negativas a receptores de estrógeno y progesterona MDA-MB-231, mientras que en células no invasivas y positivas a receptores de estrógeno y progesterona MCF7 induce un incremento únicamente en la expresión de IR. Dado lo anterior, en el presente trabajo se propuso que el AL media la expresión diferencial de IR e IGF-1R a través de la activación de vías de señalización específicas, incluyendo la vía de Src y LOXs, en células de cáncer de mama promoviendo la progresión del cáncer mamario. Respaldando nuestra propuesta, se ha demostrado la sobreexpresión de IR en tumores de cáncer mamario, mientras que la expresión de IGF-1R está asociada con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan HER2 y tumores triple negativo [113-115].

Los receptores acoplados a proteínas G, FFAR1 y FFAR4, son activados por FFAs de cadena media y larga, incluyendo al ácido oleico y al AL. De manera específica, FFAR4 está acoplado a proteínas Gq/11 y está expresado en el intestino y en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7 [51, 56, 116]. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la inhibición de la actividad de FFAR4 inhibió completamente la

expresión de IR e IGF-1R inducida por el tratamiento con AL en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Con base en los resultados obtenidos, se propone que AL regula el incremento de la expresión IR e IGF-1R vía la activación de FFAR4 en células MDA-MB-231, sin embargo aún debe ser estudiada la participación del FFAR1.

La insulina es la principal hormona implicada en la regulación metabólica de carbohidratos, sin embargo, también contribuye a la regulación del metabolismo de lípidos y proteínas. Además, la insulina es un factor de crecimiento que participa en la proliferación y migración celular así como también es considerada como un inhibidor de apoptosis [117, 118]. En este estudio se demostró que la insulina induce migración en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7 y que el pretratamiento con AL promueve, en dichas células, que el proceso de migración inducido por la insulina sea mayor.

La proliferación excesiva de células epiteliales y la aparición de angiogenesis son marcadores de la iniciación y crecimiento temprano de cánceres epiteliales primarios [119]. La subsecuente adquisición de invasividad (invasión a través de la membrana basal), se ha sugerido como el inicio de la metástasis tumoral [120].

Con base en lo anterior, se evaluaron dichos procesos, demostrando que la insulina induce migración, proliferación, invasión y secreción de MMP-9 en células MDA-MB-231. De manera interesante, se encontró que el pretratamiento de las células MDA-MB-231 con AL 90  $\mu$ M aumenta la respuesta de la insulina sobre los efectos biológicos antes mencionados (migración, proliferación, invasión y secreción de MMP-9). Además, también demostramos que el pretratamiento con AL induce una sobreexpresión de IR e IGF-1R.

Puesto que la insulina inicia su señalización a través de su unión con el IR e IGF-1R para mediar diversos procesos biológicos [71], se que el aumento en la respuesta de los procesos biológicos mediados por insulina en las células MDA-MB-231 pretratadas con AL resultan de la sobreexpresión de IR

e IGF-1R. De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado que, a diferencia de las células epiteliales de mama normal, las células de cáncer mamario presentan una elevada respuesta a la insulina mediada por el IR [121].

Estudios epidemiológicos y animales sugieren fuertemente una asociación entre una dieta rica en ácidos grasos y un incremento en el riesgo de cáncer de mama, mientras que los niveles elevados de ácidos grasos libres en la obesidad, también están asociados con un aumento en el riesgo de desarrollar de cáncer de mama [40, 122].

Con los resultados obtenidos en este estudio, se demostró que el AL induce procesos de migración e invasión en las células MDA-MB-231, por lo que se propone que en pacientes con cáncer de mama, los ácidos grasos libres, incluyendo al AL, regulan la sobreexpresión de los receptores de insulina IR e IGF-1R, incrementando de esta forma, la respuesta de procesos biológicos tales como migración, proliferación e invasión celular. Por lo tanto, la exposición de las células de cáncer de mama a AL y la sobreexpresión de los receptores de insulina podrían jugar un papel importante en los procesos de invasión y metastasis en esta neoplasia.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que concentraciones elevadas de insulina en plasma de mujeres con cáncer mamario están asociadas a un incremento en el riesgo de recurrencia en sitios distantes y mal pronóstico [123, 124]. Así mismo, se ha descrito una asociación entre ratones hembra MKR con cáncer de mama y elevados niveles de insulina, siendo así la hiperinsulinemia la promotora del crecimiento y tumorigénesis de las glándulas mamarias [125]. Sin embargo, el papel de la insulina y su receptor (IR) durante la TEM no ha sido estudiada a detalle.

Durante el proceso de TEM, las células epiteliales cambian su fenotipo y se convierten en células individuales no-polarizadas con capacidad de movilidad e invasión. Esto involucra diferentes procesos celulares incluyendo el desmantelamiento de las uniones célula-célula, como las uniones adherentes, acompañado de la pérdida o reducción de la expresión de E-cadherina, así como la reorganización del citoesqueleto de actina que pasa

de un estado epitelial cortical hacia la formación de fibras de estrés ancladas a complejos focales [126].

E-cadherina, una glucoproteína de 120 kDa, es la molécula de adhesión más estudiada y es expresada en células epiteliales [127], mientras que las células mesenquimales expresan varios tipos de cadherinas, dentro de las cuales podemos encontrar N-cadherina, R-cadherina y cadherina-11. La expresión de E-cadherina está regulada negativamente por mecanismos como mutaciones, metilaciones del ADN, así como por el control transcripcional dado por factores de transcripción como Snail1 y 2, Twist1 y 2, ZEB1 y Sip1, los cuales se unen al promotor de E-cadherina en secuencias consenso denominadas E-box, promoviendo la represión de la transcripción [82]. En este estudio se demostró que la insulina promueve una reducción en la expresión de E-cadherina a nivel de proteína y ARNm. Con los resultados obtenidos utilizando un modelo *in vitro* se sugiere que la pérdida de E-cadherina promueve el desensamble de las uniones célula-célula, lo cual ha sido considerado uno de los pasos principales de la TEM [120]. Así mismo, los resultados concuerdan con reportes previos donde la inhibición de E-cadherina en células epiteliales de mama humana promueve un proceso de TEM e invasión [128]. Por lo tanto, sugerimos que la insulina es un inductor de la pérdida de E-cadherina, lo cual promueve el proceso de TEM en nuestro modelo de células MCF10A.

La TEM involucra la disminución de características epiteliales y aumento de los marcadores mesenquimales entre los que podemos encontrar a N-cadherina, vimentina, fibronectina y MMPs. N-cadherina es expresada típicamente en células mesenquimales y su expresión en células epiteliales cancerosas les confiere la capacidad de movilidad e invasividad [104]. Durante la TEM, el intercambio de cadherinas proadhesivas y epiteliales (E-cadherina) por cadherinas promigratorias (N-cadherina) juega un papel importante debido a que promueve procesos como migración, invasión y metástasis de células de cáncer de mama [129-131]. Los resultados de este estudio demostraron que la insulina induce un incremento transitorio a nivel

de proteína de N-cadherina dependiente del tiempo en células epiteliales de mama MCF10A. Estos resultados, en conjunto con la pérdida de E-cadherina, previamente descrita, concuerdan con reportes en los que se observó que la expresión *de novo* de N-cadherina promueve la pérdida de la función de E-cadherina en células tumorales [132]. Al igual que en el modelo de MCF10A utilizado en este estudio, en células epiteliales de mama BT-20 la expresión de N-cadherina les confiere capacidad de movilidad, sugiriendo que N-cadherina participa directamente en la movilidad de células epiteliales [133]. En el presente estudio, la expresión de N-cadherina así como la pérdida de E-cadherina sugiere un cambio de cadherinas inducido por la insulina, lo cual promueve un proceso de TEM en células MCF10A.

Por otro lado, la vimentina forma parte de los filamentos intermedios que se asocian con organelos celulares, elementos de citoesqueleto y adhesiones de la membrana, las cuales reflejan su integración en la estructura y función celular [134]. En adultos, la expresión de vimentina está presente en todas las células mesenquimales del tejido conectivo [135]. A nivel molecular, vimentina se asocia con PKC, Yes, pRaf-1 y puede ser sustrato de PAK, Rho, Aurora B y GMPc, siendo así una proteína importante de andamio durante la transducción de señales. Eriksson y colaboradores demostraron que vimentina es fosforilada en serinas y treoninas, en su dominio de cabeza e interacciona con miembros de la familia de 14-3-3 para regular su polimerización [136]. Además, vimentina regula migración celular en células mesenquimales y su expresión ha sido observada en células epiteliales que experimentan un proceso de TEM en condiciones fisiológicas y patológicas [95]. Particularmente, los filamentos de vimentina conectan el núcleo con la membrana plasmática y contribuyen a la formación de adhesiones asociadas a vimentina en fibroblastos [137]. Sin embargo, la vimentina interactúa con Scrib, la cual es una proteína asociada con migración celular y previene su degradación en el proteosoma, sugiriendo que la TEM conduce a la estabilización de Scrib, lo cual promueve la migración e invasión celular [138]. Los resultados del presente estudio

demostraron que la insulina promueve un incremento en la expresión de vimentina de manera transitoria. Estos datos coinciden con reportes previos, en los cuales la vimentina está selectivamente sobreexpresada en líneas celulares de cáncer de mama, y dicha expresión se relaciona con la adquisición de características mesenquimales como fibronectina, tenascina C y proteoglicanos [139]. Así mismo, los resultados del presente estudio concuerdan con reportes previos donde la sobreexpresión de vimentina se correlaciona con el aumento en la migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mama y el incremento en su expresión se asocia con la progresión tumoral y un mal pronóstico en los pacientes [140, 141]. Por lo tanto, con base en los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que la expresión de vimentina en células MCF10A aumenta la migración y el proceso de TEM. De igual manera, se demostró que la expresión de vimentina inducida por la insulina requiere de la actividad del IR. Además, se analizó la expresión de vimentina mediante microscopía confocal en ensayos de cierre de herida se observó que la insulina induce un incremento en la expresión de vimentina, principalmente en las células presentes en los bordes de la herida, donde las células se encuentran migrando. Este resultado concuerda con las observaciones hechas por Gilles y colaboradores que en ensayos de cierre de herida observaron la sobreexpresión de vimentina en células MCF10A, en el borde de la herida, lo cual les confiere la capacidad de migración regulada por EGF [142]. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan la idea de que la insulina induce un proceso de TEM mediado por la expresión de N-cadherina y vimentina en células epiteliales de mama MCF10A.

Durante la progresión tumoral, NFκB regula la expresión de proteínas importantes para el desarrollo de la TEM, entre las que podemos encontrar represores transcripcionales de E-cadherina, vimentina, MMP-2 y MMP-9 [94]. Las MMPs han sido ampliamente relacionadas a la TEM, debido a que en el microambiente tumoral se han encontrado cantidades elevadas de MMPs; la síntesis y secreción de MMPs facilita la invasión celular y la

metástasis, además de promover la activación de células del estroma que promueven la progresión tumoral en colaboración de las MMPs [143]; mientras que en cáncer de mama se han reportado niveles elevados de MMP-9, asociándolos con un mal pronóstico [144, 145]. Los resultados del presente estudio demostraron que el tratamiento con insulina induce la activación de NFκB y el aumento en la secreción de MMP-2 y MMP-9. Los datos observados en este estudio concuerdan con reportes en los que utilizando cultivos de células MCF10A tratados con TGF-β, se observa un incremento en la producción de MMP-2 y MMP-9, dicho evento estaría regulado por la activación de la vía p38 MAPK [146]; mientras que la sobreexpresión de la subunidad p65 de NFκB en células MCF10A (MCF10A/p65) demostró la supresión de genes epiteliales como E-cadherina y desmoplakina, y la expresión *de novo* de vimentina, los cuales fueron eventos similares a los demostrados en el presente estudio. De la misma manera, se ha reportado que la activación de NFκB tiene como blancos transcripcionales a los factores de transcripción de la familia de Snail y Twist [147, 148], así como MMP-9 [94] que activa a MMP-2, favoreciendo el proceso de TEM, lo cual apoya los resultados obtenidos en el presente estudio. Debido a que ciertos factores reprimen la expresión de E-cadherina, en el presente estudio se evaluó el efecto de la insulina sobre la expresión de los factores de transcripción Snail1 y Twist2. Los resultados obtenidos demostraron que en los extractos nucleares derivados de cultivos de células MCF10A estimulados con insulina, existen proteínas que se unen a secuencias consenso del ADN denominadas cajas-E. Así mismo, se demostró que la insulina induce un decremento de los transcritos de Twist1/2 y un incremento de ZEB1. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone que la insulina induce la expresión de los factores de transcripción que se unen a las cajas-E y que inhiben la expresión de E-cadherina en células MCF10A. Debido a que los resultados únicamente muestran sobrerregulación de ZEB1, se propone que los factores de transcripción estudiados median la regulación negativa de la expresión de

E-cadherina a diferentes tiempos de estimulación con insulina. Particularmente, ZEB1 media la regulación negativa de la expresión de E-cadherina a las 6 h de estimulación con insulina. Además, se propone que la insulina induce un proceso de TEM a través de una vía dependiente de IR en células MCF10A.

TEM es un proceso caracterizado por la habilidad de las células para migrar e invadir a través de la EMC, la cual está regulada por la activación de diversas cinasas incluidas FAK y Src [39, 149]. FAK juega un papel importante en la regulación de las interacciones de la matriz celular, formación de contactos focales y controla procesos celulares como migración, sobrevivencia, invasividad y TEM [40, 149]. En el presente estudio, se demostró que la insulina induce la activación de FAK, migración e invasión en células MCF10A. Además, la insulina induce los procesos de migración e invasión a través de una vía dependiente de IR. La insulina también induce una migración cohesiva, de manera que las células en el frente de migración presentaron una morfología elongada parecida a la de los fibroblastos. Estos resultados avalan la propuesta de que la insulina induce un proceso de TEM a través de una vía dependiente de IR en células MCF10A. Los resultados y propuesta del presente estudio ha sido apoyado debido a que en una línea de hepatocito murino, TGF- $\beta$  promueve la regulación positiva de marcadores mesenquimales y deslocalización de E-cadherina unida a membrana vía la activación de FAK, mientras que la señalización de IGF-1 induce un proceso de TEM en células de cáncer de mama MCF7 [150, 151].

La insulina es capaz de unirse al IR con alta afinidad y regular la activación de su vía de señalización así como diversos procesos biológicos. La insulina también es capaz de unirse al IGF-1R pero lo hace con menor afinidad. Tanto IR como IGF-1R son expresados en células MCF10A [71, 152]. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la insulina no induce un incremento en la expresión del IR, sin embargo sí induce procesos de migración, invasión y expresión de vimentina a través de

una vía de señalización dependiente del IR en células MCF10A. Migración e invasión son marcadores de la TEM, y la adquisición de marcadores mesenquimales, tales como vimentina, son requeridos para mediar dicho proceso celular [80, 95], los resultados del presente estudio demostraron que la insulina promueve un proceso de TEM a través de una vía dependiente del IR en células MCF10A.

## **X. CONCLUSIÓN**

En primera instancia, nosotros concluimos que en cultivos de células de cáncer de mama MDA-MB-231 el AL induce una sobre-expresión de IR e IGF-1R a través de la activación de FFARs, lo cual incrementa la respuesta biológica mediada por la insulina, tal es el caso de procesos como migración, proliferación e invasión celular.

Por otra parte, se concluye que la insulina induce un proceso similar al de TEM a través de una vía dependiente del IR en células epiteliales mamarias MCF10A, ya que la insulina promueve una disminución de la expresión de E-cadherina, acompañada con un incremento de la expresión de N-cadherina y vimentina. La insulina también induce la activación de FAK, incremento en la actividad de unión a ADN de NFκB, secreción de MMP-2 y MMP-9, migración e invasión celular. Además, la migración e invasión celular y el incremento de la expresión de vimentina requiere de la actividad del IR.

En conjunto, los resultados del presente estudio sugieren fuertemente que la insulina juega un papel importante en la invasión y metástasis de cáncer mamario.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez-Cuevas, S., et al., *Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries*. *Cancer*, 2001. **91**(4): p. 863-8.
2. Resendiz-Colosia, J.A., et al., *[Primary melanoma of the oral mucosa. Experience of the Oncology Hospital of Centro Medico Nacional Siglo XXI]*. *Cir Cir*, 2007. **75**(4): p. 257-62.
3. Hansen, R.K. and M.J. Bissell, *Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones*. *Endocr Relat Cancer*, 2000. **7**(2): p. 95-113.
4. Russo, J. and I.H. Russo, *Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis*. *Lab Invest*, 1987. **57**(2): p. 112-37.
5. Knaul, F.M., et al., *Breast cancer in Mexico: a pressing priority*. *Reprod Health Matters*, 2008. **16**(32): p. 113-23.
6. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(8): p. 591-602.
7. Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay, *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 1999. **49**(1): p. 33-64, 1.
8. Parkin, D.M., *Global cancer statistics in the year 2000*. *Lancet Oncol*, 2001. **2**(9): p. 533-43.
9. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*, 2002. **52**(1): p. 23-47.
10. Bray, F., et al., *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995*. *Eur J Cancer*, 2002. **38**(1): p. 99-166.
11. Rodríguez-Cuevas, S., C.G. Macias Martinez, and S. Labastida Almendaro, *[Breast cancer in Mexico. Is it a young women disease?]*. *Ginecol Obstet Mex*, 2000. **68**: p. 185-90.
12. Nathanson, K.L. and B.L. Weber, *"Other" breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(7): p. 715-20.
13. Nathanson, K.L., R. Wooster, and B.L. Weber, *Breast cancer genetics: what we know and what we need*. *Nat Med*, 2001. **7**(5): p. 552-6.
14. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(5): p. 1117-30.
15. Larson, J.S., J.L. Tonkinson, and M.T. Lai, *A BRCA1 mutant alters G2-M cell cycle control in human mammary epithelial cells*. *Cancer Res*, 1997. **57**(16): p. 3351-5.
16. Gowen, L.C., et al., *BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage*. *Science*, 1998. **281**(5379): p. 1009-12.
17. Zhong, Q., et al., *Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response*. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 747-50.
18. Easton, D.F., et al., *Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium*. *Am J Hum Genet*, 1993. **52**(4): p. 678-701.
19. Wooster, R. and M.R. Stratton, *Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels*. *Trends Genet*, 1995. **11**(1): p. 3-5.

20. Connor, F., et al., *Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 423-30.
21. Chen, J.J., et al., *BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway*. Cancer Res, 1999. **59**(7 Suppl): p. 1752s-1756s.
22. Akiyama, T., et al., *The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity*. Science, 1986. **232**(4758): p. 1644-6.
23. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S3-8.
24. Naber, S.P., et al., *Strategies for the analysis of oncogene overexpression. Studies of the neu oncogene in breast carcinoma*. Am J Clin Pathol, 1990. **94**(2): p. 125-36.
25. Kallioniemi, O.P., et al., *ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5321-5.
26. Slamon, D.J., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. **244**(4905): p. 707-12.
27. Ross, J.S. and J.A. Fletcher, *The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy*. Oncologist, 1998. **3**(4): p. 237-252.
28. Vogel, V.G., *Breast cancer prevention: a review of current evidence*. CA Cancer J Clin, 2000. **50**(3): p. 156-70.
29. Toniolo, P.G., et al., *A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(3): p. 190-7.
30. Dorgan, J.F., et al., *Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996. **5**(7): p. 533-9.
31. Thomas, H.V., et al., *A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer risk in post-menopausal women on the island of Guernsey*. Br J Cancer, 1997. **76**(3): p. 401-5.
32. Hankinson, S.E., et al., *Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(17): p. 1292-9.
33. Kaaks, R., et al., *Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(10): p. 755-65.
34. Feigelson, H.S. and B.E. Henderson, *Estrogens and breast cancer*. Carcinogenesis, 1996. **17**(11): p. 2279-84.
35. Cavalieri, E.L., et al., *Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10937-42.
36. Smith-Warner, S.A., et al., *Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies*. JAMA, 1998. **279**(7): p. 535-40.
37. Pariza, M.W., *Dietary fat, calorie restriction, ad libitum feeding, and cancer risk*. Nutr Rev, 1987. **45**(1): p. 1-7.
38. Welsch, C.W., *Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique*. Cancer Res, 1992. **52**(7 Suppl): p. 2040s-2048s.
39. Wu, A.H., M.C. Pike, and D.O. Stram, *Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(6): p. 529-34.
40. Calle, E.E. and R. Kaaks, *Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 579-91.
41. Goodwin, P.J. and V. Stambolic, *Obesity and insulin resistance in breast cancer--chemoprevention strategies with a focus on metformin*. Breast, 2011. **20 Suppl 3**: p. S31-5.

42. Rizos, C.V. and M.S. Elisaf, *Metformin and cancer*. Eur J Pharmacol, 2013. **705**(1-3): p. 96-108.
43. Arab, L., *Biomarkers of fat and fatty acid intake*. J Nutr, 2003. **133 Suppl 3**: p. 925S-932S.
44. Benatti, P., et al., *Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties*. J Am Coll Nutr, 2004. **23**(4): p. 281-302.
45. Prentki, M. and S.R. Madiraju, *Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease*. Endocr Rev, 2008. **29**(6): p. 647-76.
46. Tvrzicka, E., et al., *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2011. **155**(2): p. 117-30.
47. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. Biotechnol J, 2006. **1**(4): p. 420-39.
48. de Lorgeril, M. and P. Salen, *New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids*. BMC Med, 2012. **10**: p. 50.
49. Tanaka, T., et al., *Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **377**(4-6): p. 523-7.
50. Costanzi, S., S. Neumann, and M.C. Gershengorn, *Seven transmembrane-spanning receptors for free fatty acids as therapeutic targets for diabetes mellitus: pharmacological, phylogenetic, and drug discovery aspects*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16269-73.
51. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 90-4.
52. Katsuma, S., et al., *Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19507-15.
53. Briscoe, C.P., et al., *The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11303-11.
54. Wettschureck, N. and S. Offermanns, *Mammalian G proteins and their cell type specific functions*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1159-204.
55. Navarro-Tito, N., T. Robledo, and E.P. Salazar, *Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells*. Exp Cell Res, 2008. **314**(18): p. 3340-55.
56. Soto-Guzman, A., et al., *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, 2008. **294**(1-2): p. 81-91.
57. Hardy, S., et al., *Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13285-91.
58. Murff, H.J., et al., *Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study*. Int J Cancer, 2011. **128**(6): p. 1434-41.
59. Wang, J., E.M. John, and S.A. Ingles, *5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein gene polymorphisms, dietary linoleic acid, and risk for breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(10): p. 2748-54.
60. Sonestedt, E., et al., *Do both heterocyclic amines and omega-6 polyunsaturated fatty acids contribute to the incidence of breast cancer in postmenopausal women of the Malmo diet and cancer cohort?* Int J Cancer, 2008. **123**(7): p. 1637-43.

61. Chajes, V., et al., *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*, 2012. **21**(2): p. 319-26.
62. Menendez, J.A., et al., *HER2 (erbB-2)-targeted effects of the omega-3 polyunsaturated fatty acid, alpha-linolenic acid (ALA; 18:3n-3), in breast cancer cells: the "fat features" of the "Mediterranean diet" as an "anti-HER2 cocktail"*. *Clin Transl Oncol*, 2006. **8**(11): p. 812-20.
63. Nony, P.A., et al., *15S-Lipoxygenase-2 mediates arachidonic acid-stimulated adhesion of human breast carcinoma cells through the activation of TAK1, MKK6, and p38 MAPK*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(36): p. 31413-9.
64. Paine, E., et al., *Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase-dependent pathway*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(15): p. 11284-90.
65. Rose, D.P., J.M. Connolly, and X.H. Liu, *Effects of linoleic acid on the growth and metastasis of two human breast cancer cell lines in nude mice and the invasive capacity of these cell lines in vitro*. *Cancer Res*, 1994. **54**(24): p. 6557-62.
66. Rose, D.P., J.M. Connolly, and X.H. Liu, *Effects of linoleic acid and gamma-linolenic acid on the growth and metastasis of a human breast cancer cell line in nude mice and on its growth and invasive capacity in vitro*. *Nutr Cancer*, 1995. **24**(1): p. 33-45.
67. Rose, D.P., J.M. Connolly, and X.H. Liu, *Fatty acid regulation of breast cancer cell growth and invasion*. *Adv Exp Med Biol*, 1997. **422**: p. 47-55.
68. Boyle, P., et al., *Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis*. *Br J Cancer*, 2012. **107**(9): p. 1608-17.
69. Michels, K.B., et al., *Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study*. *Diabetes Care*, 2003. **26**(6): p. 1752-8.
70. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
71. Heidegger, I., et al., *Targeting the insulin-like growth factor network in cancer therapy*. *Cancer Biol Ther*, 2011. **11**(8): p. 701-7.
72. Avruch, J., *Insulin signal transduction through protein kinase cascades*. *Mol Cell Biochem*, 1998. **182**(1-2): p. 31-48.
73. Lawrence, M.C., N.M. McKern, and C.W. Ward, *Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor*. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(6): p. 699-705.
74. De Meyts, P., *The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors?* *Trends Biochem Sci*, 2008. **33**(8): p. 376-84.
75. Belfiore, A., et al., *Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease*. *Endocr Rev*, 2009. **30**(6): p. 586-623.
76. Noto, H., et al., *Latest insights into the risk of cancer in diabetes*. *J Diabetes Investig*, 2013. **4**(3): p. 225-32.
77. Gralow, J.R., *Optimizing the treatment of metastatic breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2005. **89 Suppl 1**: p. S9-S15.
78. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, *Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?* *Cancer Res*, 2005. **65**(14): p. 5991-5; discussion 5995.
79. Perl, A.K., et al., *A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma*. *Nature*, 1998. **392**(6672): p. 190-3.

80. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
81. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell, 2004. **117**(7): p. 927-39.
82. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
83. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 548-58.
84. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
85. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol, 2006. **172**(7): p. 973-81.
86. Stemmer, V., et al., *Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin*. Oncogene, 2008. **27**(37): p. 5075-80.
87. De Wever, O., et al., *Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(3): p. 481-94.
88. Hollier, B.G., K. Evans, and S.A. Mani, *The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009. **14**(1): p. 29-43.
89. Nguyen, Q.D., et al., *Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment*. Oncogene, 2005. **24**(56): p. 8240-51.
90. Van Aken, E., et al., *Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer*. Virchows Arch, 2001. **439**(6): p. 725-51.
91. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
92. Blanco, M.J., et al., *Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas*. Oncogene, 2002. **21**(20): p. 3241-6.
93. Huber, M.A., et al., *NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 569-81.
94. Min, C., et al., *NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer*. J Cell Biochem, 2008. **104**(3): p. 733-44.
95. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 740-6.
96. Espinosa-Neira, R., et al., *Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(12): p. 1782-91.
97. Djiogue, S., et al., *Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs*. Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(1): p. R1-R17.
98. Gallagher, E.J. and D. LeRoith, *Minireview: IGF, Insulin, and Cancer*. Endocrinology, 2011. **152**(7): p. 2546-51.
99. Sparks, S.M., et al., *Identification of diarylsulfonamides as agonists of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120)*. Bioorg Med Chem Lett, 2014. **24**(14): p. 3100-3.
100. Serna-Marquez, N., et al., *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), 2013. **36**(1): p. 65-77.

101. Pan, F. and L.Q. Hong, *Insulin promotes proliferation and migration of breast cancer cells through the extracellular regulated kinase pathway*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(15): p. 6349-52.
102. Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev, *Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors*. Trends Mol Med, 2008. **14**(5): p. 199-209.
103. Vandewalle, C., et al., *SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(20): p. 6566-78.
104. Wheelock, M.J., et al., *Cadherin switching*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 6): p. 727-35.
105. Cowin, P., T.M. Rowlands, and S.J. Hatsell, *Cadherins and catenins in breast cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 499-508.
106. Dawood, S., et al., *Prognostic value of body mass index in locally advanced breast cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(6): p. 1718-25.
107. Majed, B., et al., *Is obesity an independent prognosis factor in woman breast cancer?* Breast Cancer Res Treat, 2008. **111**(2): p. 329-42.
108. Wang, J., et al., *Dietary fat, cooking fat, and breast cancer risk in a multiethnic population*. Nutr Cancer, 2008. **60**(4): p. 492-504.
109. Binukumar, B. and A. Mathew, *Dietary fat and risk of breast cancer*. World J Surg Oncol, 2005. **3**: p. 45.
110. Lopez, R., P. Agullo, and R. Lakshmanaswamy, *Links between obesity, diabetes and ethnic disparities in breast cancer among Hispanic populations*. Obes Rev, 2013. **14**(8): p. 679-91.
111. Boura-Halfon, S. and Y. Zick, *Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(4): p. E581-91.
112. Rose, D.P. and L. Vona-Davis, *The cellular and molecular mechanisms by which insulin influences breast cancer risk and progression*. Endocr Relat Cancer, 2012. **19**(6): p. R225-41.
113. Frittitta, L., et al., *Structural and functional studies of insulin receptors in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1993. **25**(1): p. 73-82.
114. Yerushalmi, R., et al., *Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) in breast cancer subtypes*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **132**(1): p. 131-42.
115. Hartog, H., et al., *Divergent effects of insulin-like growth factor-1 receptor expression on prognosis of estrogen receptor positive versus triple negative invasive ductal breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **129**(3): p. 725-36.
116. Miyauchi, S., et al., *Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009. **379**(4): p. 427-34.
117. Draznin, B., *Mechanism of the mitogenic influence of hyperinsulinemia*. Diabetol Metab Syndr, 2011. **3**(1): p. 10.
118. Sasaoka, T., et al., *Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13689-94.
119. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
120. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
121. Papa, V., et al., *Elevated insulin receptor content in human breast cancer*. J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1503-10.

122. Lee, M.M. and S.S. Lin, *Dietary fat and breast cancer*. *Annu Rev Nutr*, 2000. **20**: p. 221-48.
123. Goodwin, P.J., et al., *Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(1): p. 42-51.
124. Goodwin, P.J., et al., *Insulin- and obesity-related variables in early-stage breast cancer: correlations and time course of prognostic associations*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(2): p. 164-71.
125. Novosyadlyy, R., et al., *Insulin-mediated acceleration of breast cancer development and progression in a nonobese model of type 2 diabetes*. *Cancer Res*, 2010. **70**(2): p. 741-51.
126. Gumbiner, B.M., *Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(8): p. 622-34.
127. Aplin, A.E., et al., *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins*. *Pharmacol Rev*, 1998. **50**(2): p. 197-263.
128. Onder, T.T., et al., *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3645-54.
129. Hazan, R.B., et al., *Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis*. *J Cell Biol*, 2000. **148**(4): p. 779-90.
130. Pishvaian, M.J., et al., *Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines*. *Cancer Res*, 1999. **59**(4): p. 947-52.
131. Li, G. and M. Herlyn, *Dynamics of intercellular communication during melanoma development*. *Mol Med Today*, 2000. **6**(4): p. 163-9.
132. Hsu, M., et al., *Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression*. *J Cell Sci*, 2000. **113** ( Pt 9): p. 1535-42.
133. Nieman, M.T., et al., *N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(3): p. 631-44.
134. Evans, R.M., *Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family*. *Bioessays*, 1998. **20**(1): p. 79-86.
135. Larsson, A., et al., *Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(-/-)Vim(-/-) mice*. *Neurochem Res*, 2004. **29**(11): p. 2069-73.
136. Eriksson, J.E., et al., *Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 6): p. 919-32.
137. Ivaska, J., et al., *Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(10): p. 2050-62.
138. Phua, D.C., P.O. Humbert, and W. Hunziker, *Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(12): p. 2841-55.
139. Gilles, C., et al., *Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(10): p. 2658-64.
140. Domagala, W., et al., *Vimentin expression appears to be associated with poor prognosis in node-negative ductal NOS breast carcinomas*. *Am J Pathol*, 1990. **137**(6): p. 1299-304.
141. Willipinski-Stapelfeldt, B., et al., *Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(22): p. 8006-14.

142. Gilles, C., et al., *Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 24)**: p. 4615-25.
143. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15(2)**: p. 201-12.
144. Li, H.C., et al., *Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **88(1)**: p. 75-85.
145. Pellikainen, J.M., et al., *Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis*. Clin Cancer Res, 2004. **10(22)**: p. 7621-8.
146. Kim, E.S., M.S. Kim, and A. Moon, *TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells*. Int J Oncol, 2004. **25(5)**: p. 1375-82.
147. Kang, Y. and J. Massague, *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. Cell, 2004. **118(3)**: p. 277-9.
148. Bachelder, R.E., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Biol, 2005. **168(1)**: p. 29-33.
149. Avizienyte, E. and M.C. Frame, *Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17(5)**: p. 542-7.
150. Cicchini, C., et al., *TGFbeta-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling*. Exp Cell Res, 2008. **314(1)**: p. 143-52.
151. Walsh, L.A. and S. Damjanovski, *IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF-beta1 resulting in epithelial to mesenchymal transition*. Cell Commun Signal, 2011. **9(1)**: p. 10.
152. Tannheimer, S.L., et al., *Benzo[a]pyrene- and TCDD-induced alterations in tyrosine phosphorylation and insulin-like growth factor signaling pathways in the MCF-10A human mammary epithelial cell line*. Carcinogenesis, 1998. **19(7)**: p. 1291-7.

**Article**

**Insulin induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A<sup>†</sup>**

**Cecilia Rodriguez-Monterrosas<sup>1</sup>, Ricardo Díaz-Aragon<sup>1</sup>, Elizabeth Leal-Orta, Pedro Cortes-Reynosa and Eduardo Perez Salazar**

Departamento de Biología Celular. Cinvestav-IPN. Av. IPN  
# 2508. San Pedro

Zacatenco. Mexico,  
DF. 07360. Mexico.

Corresponding

Author:

Eduardo Perez  
Salazar, Ph.D

Departamento  
de Biología  
Celular.

Cinvestav-IPN.

Av. IPN #  
2508. Mexico,  
DF 07360.

Mexico

Telephone:

52 -55- 5747-  
3991

Fax number: 52 -55- 5747-3393

E-mail: [jperez@cell.cinvestav.mx](mailto:jperez@cell.cinvestav.mx)

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>†</sup>This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: [10.1002/jcb.26582]

**Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.**

**Received 3 April 2017; Revised 30 November 2017; Accepted 7 December 2017**

**Journal of  
Cellular Biochemistry This article  
is protected by copyright. All  
rights reserved DOI  
10.1002/jcb.26582**