

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE

BIOLOGÍA CELULAR

"Participación de GPR40, GPR120, GPR31, 12-LOX y la vía PI3K/Akt2 en la migración e invasión celular inducida por ácido oleico en células de cáncer de mama"

TESIS

Que presenta

MA. CLEOFAS MARCIAL MEDINA

Para obtener el Grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Director de la Tesis: Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Ciudad de México

MARZO, 2019

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Dr. José Eduardo Pérez Salazar, siendo becaria CONACYT de agosto de 2013 a julio de 2017.

Dedicatoria

Dedico la presente tesis a mis padres y hermanos,

quienes son el soporte de mi vida, por brindarme siempre

su cariño, apoyo y confianza incondicional.

Agradecimientos

A mi director de tesis Dr. José Eduardo Pérez Salazar, por darme la oportunidad de estar en éste proyecto de tesis, así como todo su apoyo, sugerencias y tiempo brindado.

A mis asesores, por la revisión y las sugerencias para realizar esta tesis.

A mis inigualables compañeros de laboratorio, al auxiliar Pedro y a la técnico Norita, por su grata compañía y por todos los buenos momentos de convivencia.

A Omar, por su apoyo, cariño y por estar conmigo en los momentos más difíciles; eres mi motivación.

A Fer y Jaz por su amistad, apoyo y cariño desde hace 7 años.

A todas aquellas personas que de alguna manera me ayudaron a concluir este proyecto de doctorado.

Índice

1.	Lista de figuras	1
2.	Abreviaturas	3
3.	Resumen	5
4.	Abstract	6
5.	Introducción	7
5.1	Glándula mamaria y cáncer de mama	7
5.2	Epidemiología del cáncer de mama	8
5.3	Factores de riesgo	9
5.3.1	Factores de riesgo hormonales y reproductivos	9
5.3.2	Factores de riesgo genéticos	10
5.3.3	Factores de riesgo relacionados con el estilo de vida	10
5.4	Ácido oleico y cáncer	12
5.5	Ácido Araquidónico, COXs, LOXs y cáncer	14
5.6	12-LOX y cáncer	15

5.7	Vía de señalización fosfatidil inositol 3-cinasa/Akt y cáncer de mama	16
5.8	Factor nuclear – κΒ (NF- κΒ) y cáncer	19
5.9	Migración, invasión y metástasis de células tumorales	20
6.	Justificación	23
7.	Hipótesis	23
8.	Objetivos	24
8.1	Objetivo general	24
8.2	Objetivos específicos	24
9.	Materiales y métodos	25
10.	Resultados	32
11.	Discusión	65
12.	Conclusión	70
13.	Referencias	71

1. Lista de figuras

Figura

1	icosanoides bioactivos derivados de ácido araquidónico 15	
2	Comparación de la estructura de dominios de las isoformas de Akt en 1 humano	
3	Modelo de motilidad celular	
4	Metástasis	22
5	El AO induce migración en células MDA-MB-231 de manera dependiente de la dosis	33
6	GPR40 participa en la regulación de la migración celular inducida por el 3 AO en células MDA-MB-231	
7	GPR120 participa en la señalización del AO en la migración celular	36
8	El AO promueve migración celular en células MCF-7 de manera dependiente de GPR40 y GPR120	37
9	El AO promueve la activación de Akt2	38
10	La migración celular inducida por AO es dependiente de la activación de PI3K y Akt2	
11	El AO induce migración a través de una vía dependiente de Akt2	42
12	En células MCF-7 la migración celular inducida por AO es dependiente de la activación de PI3K y Akt2	
13	Papel de PI3K en la formación de contactos focales	44
14	El AO induce invasión en la línea celular MDA-MB-231 de manera dependiente de la activación de PI3K y Akt2	45
15	La migración celular es dependiente de la activación de EGFR	47
16	El AO induce la activación del factor de transcripción NF-κB en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7	48

17	La activación de NF-kB inducida por el AO es dependiente de la actividad de PI3K, Akt y EGFR	49
18	La migración celular inducida por AO es dependiente de la vía de 12- LOX	52
19	El AO induce migración a través de una vía dependiente de 12-LOX	53
20	La migración celular inducida por AO en células MCF-7 es dependiente de la vía de 12-LOX	54
21	La vía de 12-LOX regula la activación de Akt2	55
22	La vía de 12-LOX regula la activación de FAK	56
23	Papel de 12-LOX en la formación de contactos focales	57
24	El AO induce un incremento en la secreción de 12-HETE en células MDA-MB-231	54
25	El AO induce migración a través de una vía dependiente de GPR31	60
26	Medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO durante 18h y 20h inducen migración celular en células Huvec	62
27	Migración inducida por medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO durante 18h y 20h en células Huvec, es dependiente de GPR31	63
28	El AO induce un incremento en la expresión del mRNA GPR31 en células MDA-MB-231	64
29	Modelo de señalización propuesto para describir el mecanismo molecular mediante el cual el AO induce migración e invasión en	69

células de cáncer de mama.

2. Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
AO	Ácido oleico
BAI	Baicalein
CDK2	Cinasa dependiente de ciclina 2
COX	Ciclooxigenasa
DTT	Ditiotreitol
EETs	Ácidos epoxieicosatrienoicos
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidermal
EMT	Transición epitelio mesénquima
FAK	Cinasa de adhesión focal
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
HETESs	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
IAPs	Proteínas inhibidoras de apoptosis
LOXs	Lipoxigenasas
LTs	Leucotrienos
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
NF-κB	Factor nuclear kappa B
PDK1	Cinasa dependiente de fosfoinosítidos-1
PH	Dominios de homología a plekstrina
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

- PI3K Fosfatidil inositol 3-cinasa
- TNF α Factor de necrosis tumoral α
- VEGF Factor de crecimiento del endotelio vascular

3. Resumen

Los ácidos grasos además de ser fuente de energía también inducen la activación de vías de señalización, las cuales regulan diversos procesos biológicos. Los ácidos grasos además de ser fuente de energía también inducen la activación de vías de señalización, las cuales regulan diversos procesos biológicos. En células de cáncer de mama el ácido oleico (AO) induce proliferación, secreción de metaloproteasa 9 (MMP-9), migración e invasión. Sin embargo, se desconocen las vías de señalización que están regulando la migración y la invasión inducida por el AO en células de cáncer de mama. Nuestros resultados demostraron que el AO induce migración, invasión, activación de Akt1, activación de Akt2, activación de 12-LOX, también induce la translocación de NFkB al núcleo e incrementa la expresión del mRNA del receptor GPR31 en células de cáncer de mama. La migración celular inducida por el AO requiere de la actividad de FFAR1, FFAR4, GPR31, EGFR, Akt y PI3K. Mientras que el proceso de invasión es dependiente de la vía de señalización de PI3K/Akt. Nuestros resultados sugieren que el AO promueve una relocalización de paxilina hacia los contactos focales y este proceso parece estar regulado por PI3K, 12-LOX y EGFR. También se demostró que la translocación de NFkB al núcleo es regulada por PI3K, Akt y EGFR. En conclusión, nuestros resultados demuestran que el AO a través de FFAR1, FFAR4 y EGFR induce la activación de vías de señalización que favorecen la activación de Akt1, Akt2, FAK, 12-LOX, GPR31 y la translocación de NFkB al núcleo de las células de cáncer de mama. Estas cascadas de señalización activadas por el AO en favorecen los procesos de migración e invasión, los cuales tienen un papel determinante en la metástasis tumoral.

4. Abstract

Free fatty acids (FFAs) are an energy source. However, they also induce activation of signal transduction pathways that mediate several biological processes. In breast cancer cells, oleic acid (OA) induces proliferation, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion, migration and invasion. However, the signal transduction pathways that mediate the migration induced by OA in breast cancer cells remain to be studied. We demonstrate here that OA induces migration, invasion, Akt1, Akt2, and 12-LOX activation, also induces an increase on NFkB-DNA binding activity and on the GPR31 mRNA expression in breast cancer cells. The cell migration induced by OA requires FFAR1, FFAR4, GPR31, EGFR, 12-LOX, Akt and PI3K activity. Moreover, cell invasion is through a PI3K/Akt-dependent pathway. Furthermore, our findings suggest that OA promotes relocalization of paxillin to focal contacts and this process seems to be regulated by PI3K, 12-LOX and EGFR. In addition, the NFkB-DNA binding activity induced by OA is regulated by PI3K, Akt and EGFR. In conclusion, our findings demonstrate that OA through FFAR1, FFAR4 and EGFR induces the activation of signal transduction pathways involved in the activation of Akt1, Akt2, FAK, 12-LOX, GPR31 and NFkB-DNA binding activity, which play a pivotal role in migration and invasion in breast cancer cells.

5. Introducción

5.1 Glándula mamaria y cáncer de mama

La glándula mamaria se desarrolla siguiendo una serie de etapas (embrionaria, prepuberal, puberal, embarazo, lactancia e involución) las cuales son reguladas por hormonas sistémicas (estrógeno y progesterona) y por factores de crecimiento locales (RANKL, inhibina β B, TGF β). En cada etapa de desarrollo, el epitelio que conforma la glándula mamaria y el estroma que la rodea, responden a diferentes señales que controlan el balance entre proliferación, diferenciación y apoptosis (1).

La mama está compuesta de tejido glandular y adiposo; está soportada por tejido conectivo fibroso denominado ligamentos de Cooper. El tejido secretorio es drenado por un sistema ductal que almacena y transporta la leche hacia el pezón durante la lactancia. El tejido glandular está constituido por lóbulos que se conforman por lobulillos los cuales contienen de 10-100 alveolos que miden aproximadamente 0.12 mm de diámetro(*2*).

El epitelio de los ductos y los alveolos secretorios consiste de dos capas de células: una capa de células epiteliales las cuales son responsables de la síntesis y secreción de la leche y una capa de células mioepiteliales que están en contacto con la lámina basal(*3*).

El cáncer de mama es una enfermedad genéticamente y clínicamente heterogénea, siendo el carcinoma ductal invasivo el subtipo más común representando el 80% de los canceres de mama invasivos diagnosticados a nivel mundial(4). El carcinoma ductal se puede desarrollar a partir de una hiperplasia ductal atípica de las células epiteliales luminales, la cual evoluciona a carcinoma ductal *in situ*, que se caracteriza por la proliferación neoplásica de células epiteliales luminales que no han atravesado la membrana basal. La transición de carcinoma ductal *in situ* a carcinoma invasivo involucra la disrupción de la capa de células mioepiteliales y la membrana basal(5). El segundo subtipo más común es el carcinoma lobular

invasivo, el cual representa aproximadamente el 10% de los canceres de mama invasivos y los subtipos menos comunes son los carcinomas mucinosos, cribiformes, papilares, tubulares, medulares, metaplásicos e inflamatorios(4). La metástasis, la cual consiste en la diseminación de las células de un tumor primario a órganos o tejidos distantes, es la causa de aproximadamente el 90% de las muertes relacionadas a cáncer. En el cáncer de mama los órganos más comunes hacia donde las células de cáncer hacen metástasis son hígado, pulmón, hueso y cerebro (6, 7).

5.2 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres y representa uno de los principales problemas de salud. Las estadísticas de GLOBOCAN muestran que en el 2018 a nivel mundial aproximadamente 2,093,876 fueron diagnosticadas con cáncer de mama y 1,761,007 murieron a causa de esta enfermedad(*8*).

En México, en el 2014 el total de casos de cáncer diagnosticados en la población mexicana de 20 años y mayores de 20 años, el de mama fue el de mayor frecuencia con 19.4%; mientras que por género, en hombres, el cáncer de mama se presenta en un 1% del total de casos. En el 2015, la incidencia de cáncer de mama entre la población de 20 años y mayores de 20 años fue de 14.80 casos nuevos por cada 100 000 personas, alcanzando su punto máximo en mujeres de entre 60 a 64 años (68.05 por cada 100 000 mujeres de ese grupo de edad). Por entidad federativa, la incidencia del cáncer de mama fue mayor en los estados de Colima, Campeche y Aguascalientes (101.08, 97.60 y 96.85 casos nuevos por cada 100 000 mujeres de 20 años, respectivamente), mientras que en el otro extremo, se encuentran los estados de Tlaxcala (8.41), Guerrero (6.82) y Chiapas (4.94), con menos de 10 casos nuevos por cada 100 000 mujeres durante el año señalado(*9*). Mientras que la mortalidad por cáncer de mama en el 2014 por entidad federativa, los estados de Chihuahua, Nuevo León y la Ciudad de México

tuvieron más de 20 fallecimientos por cada 100 000 mujeres de 20 y mayores de 20 años (25.91, 22.40 y 21.41, respectivamente), siendo Campeche la entidad con la tasa más baja (5.86 muertes por cada 100 000 mujeres) le siguieron Oaxaca y Quintana Roo, con menos de 10 muertes por cada 100 000 mujeres(*10*). En el 2016 la tasa de mortalidad debido a cáncer de mama fue la más alta, con 16 defunciones por cada 100 000 (*11*).

5.3 Factores de riesgo

5.3.1 Factores de riesgo hormonales y reproductivos

Las hormonas que afectan el crecimiento de la glándula mamaria tales como estrógeno y progesterona son factores de riesgo potenciales para el desarrollo de cáncer de mama(12), debido a que estas hormonas inducen proliferación celular en la glándula mamaria. Los estrógenos a través de su receptor RE-α promueve el crecimiento y elongación de los conductos inmersos en el tejido adiposo mamario, mientras que la progesterona mediante la activación de su receptor induce el desarrollo de unidades terminales o acinos (alveologénesis)(13). El desarrollo de cáncer de mama se encuentra íntimamente relacionado con el tiempo de exposición hormonal. Existen evidencias epidemiológicas donde la historia reproductiva tiene un papel importante en la determinación del riesgo, puesto que al comparar mujeres que experimentaron una menarca temprana antes de los 11 años con mujeres que presentaron una menarca tardía hasta o después de los 14 años de edad, el riesgo en estas últimas disminuyó un 54%(14). Por otro lado, una menopausia tardía también incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama debido a que prolonga la exposición a niveles elevados de estrógenos y progesterona (15). Otro factor es la edad del primer embarazo, al comparar mujeres nulíparas con mujeres que tuvieron su primer embarazo antes de los 30 años de edad, en las del último grupo se reduce hasta un 50% el riesgo de desarrollar cáncer de mama, mientras que en aquellas mujeres que no tuvieron hijos o tuvieron su primer hijo después de los 35 años se incrementa el riesgo alrededor de un

22%(*16*). El uso de anticonceptivos orales y terapia hormonal de reemplazo en mujeres de 35 a 64 años, genero un pequeño incremento del riesgo relativo, para las mujeres que estaban usando anticonceptivos orales el riesgo relativo fue de 1.0 y de 0.9 para las mujeres que ya no estaban usando anticonceptivos orales cuando se realizó el estudio (*17*).

5.3.2 Factores de riesgo genéticos

Los casos de cáncer de mama hereditarios representan aproximadamente entre el 5 y 10% del total de los casos (*18*). En este tipo de cancer existen mutaciones en la línea germinal, las cuales afectan genes que son críticos para mantener la integridad genómica. Mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 confieren de por vida un riesgo elevado de aproximadamente 50 a 80% para desarrollar cáncer de mama, mientras que para desarrollar cáncer de ovario elevan en un 20 a 40% el riesgo. Otra alteración genética importante es la amplificación del gen HER-2/neu, un oncogén que codifica para un receptor miembro de la la familia del factor de crecimiento epidermal. El receptor HER2/neu es un receptor tirosina cinasa transmembranal de 185 kDa expresado en células epiteliales. En cáncer de mama la amplificación de este gen ha sido detectada en un 25 a 35% en los carcinomas mamarios y es fuertemente asociada con un mal pronóstico(*19*).

5.3.3 Factores de riesgo relacionados con el estilo de vida

La incidencia de cáncer de mama varía ampliamente por áreas geográficas en todo el mundo, la gran mayoría de estas diferencias podrían ser explicadas con base a hábitos de salud y estilo de vida (*20*). Estudios en modelos animales y estudios *in vitro* han demostrado que componentes que se encuentran en el humo de tabaco tales como hidrocarburos policíclicos, aminas aromáticas y *N*-nitrosaminas pueden inducir tumores mamarios (*21*). El consumo de alcohol también está asociado con un incremento moderado en el riesgo de padecer cáncer de mama en un rango del 3 al 9% para un consumo de 10 g por día. El mecanismo biológico de esta

asociación está relacionado con los niveles de estrógenos en circulación. Estudios demuestran que un consumo moderado de alcohol incrementa los niveles de estrógenos en sangre tanto en mujeres premenopáusicas como en postmenopáusicas. Otros estudios experimentales demuestran que la estimulación con alcohol a células de cáncer de mama resulta en la activación de vías de transducción de señales y proliferación mediada por estrógenos (22). Por otra parte, la obesidad en mujeres postmenopáusicas incrementa hasta tres veces más el riesgo de padecer cáncer de mama, esto es debido al incremento de las concentraciones de estrógenos biológicamente activos, como resultado de la conversión de androstenediona a estrógenos (23). La actividad física puede contribuir a reducir el riesgo de desarrollar cáncer de mama a través de la reducción del tejido adiposo así como por la disminución de los niveles biodisponibles de hormonas sexuales, insulina y otros factores de crecimiento (24).

En cuanto a la dieta, estudios epidemiológicos indican que mujeres con dietas ricas en grasas tienen un riesgo cinco veces mayor de padecer cáncer de mama, que aquellas mujeres con consumo bajo en grasas (*25, 26*). Por otro lado, estudios en modelos animales han demostrado que altos niveles de grasas en la dieta, potencian significativamente la tumorigénesis en la glándula mamaria (*27*). Por lo cual se han propuesto varios mecanismos por los cuales los lípidos de la dieta pueden ejercer sus efectos en el proceso canceroso, incluyendo la carcinogénesis, tales como alteración de los niveles hormonales, modificaciones de la estructura y función de la membrana celular, alteraciones de las vías de transducción de señales, modulación de la expresión de genes específicos y efectos de inmunosupresión (*28*).

5.4 Ácido oleico y cáncer

Los ácidos grasos son los principales componentes de fosfolípidos, triglicéridos y esteres de colesterol. Con base en la longitud de su cadena de carbono se clasifican como ácidos de cadena corta (2-4 átomos de carbono), cadena mediana (6-12 átomos de carbono), de cadena larga (14-18 átomos de carbono). También se clasifican como ácidos grasos saturados (sin doble enlace), monoinsaturados (con un doble enlace) y polinsaturados (dos o más dobles enlaces) (*29*). Y de acuerdo a la posición del primer doble enlace desde el extremo metilo de la molécula de un ácido graso se clasifican como n-3 (o ω 3), n-6 (o ω 6) y n-9 (o ω 9) (*30*).

Las principales fuentes de los ácidos grasos monoinsaturados son aceites de origen vegetal y animal, mientras que los poliinsaturados se encuentran principalmente en huevo, pescado y mariscos (*31*). El ácido oleico (AO) es el ácido graso monoinsaturado más abundante en la dieta (*32*), es un ácido graso omega-9, está constituido por 18 átomos de carbono (C:18:1), con una insaturación en la posición nueve. Este ácido graso se encuentra en aceites de origen vegetal y animal; siendo el principal ácido graso constituyente en el aceite de oliva (*33*). Diversos estudios demuestran una relación positiva entre ácidos grasos monoinsaturados y cáncer de mamá (*34, 35*).

Los efectos de los ácidos grasos en diversos procesos biológicos pueden estar mediados por mecanismos tales como la señalización a través de receptores de superficie celular. Se han identificado una serie de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que pueden ser activados por ácidos grasos libres. Los GPCRs son la familia más grande de receptores de membrana codificados en el genoma humano. Estos receptores se encuentran regulando una amplia variedad de funciones incluyendo proliferación, sobrevivencia, respuesta inmune, regulación de la presión sanguínea, contracción del músculo liso y cardiaco; además de estar implicados en la progresión y metástasis en cáncer. Los GPCRs tienen una sola cadena peptídica cuyo extremo amino terminal se localiza en la porción extracelular

de la célula y el extremo carboxilo en el citoplasma; la cadena atraviesa la membrana de la célula siete veces y presenta tres asas intracelulares y tres asas extracelulares. La activación de estos receptores por sus ligandos, genera cambios conformacionales en el receptor permitiendo que su dominio citosólico se una a proteínas G. las proteínas G están formadas por tres subunidades denominadas α , β , y γ . En estado inactivo la subunidad α de la proteína G, se encuentra unida a una molécula de GDP. Cuando se une a un GPCR activado ocurre un intercambio de nucleótido en la subunidad α de la proteína y el sitio del GDP es ocupado por una molécula de GTP. Posteriormente ocurre la separa de la subunidad α de las subunidades $\beta\gamma$, permitiendo que cada una module la actividad de proteínas efectoras específicas. Por ejemplo la subunidad α es capaz de interactuar con la fosfolipasa C y la proteína RhoGEFs; mientras que el dímero $\beta\gamma$ puede reclutar proteínas tales como cinasas, fosfolipasas y también pueden modular la actividad de canales iónicos (*36, 37*).

Entre los receptores activados por ácidos grasos libres (FFARs), FFAR2 (GPR43) y FFAR3 (GPR41) son receptores para ácidos grasos de cadena corta; mientras que FFAR1 (GPR40) y GPR120 son activados por ácidos grasos de cadena mediana y larga(14 – 18 átomos de carbono) (*38*). FFAR1 se expresa en células α y β pancreáticas, células K y L de intestino delgado y grueso así como también en células mononucleares de sangre periférica. Este receptor está acoplado a proteínas G α_i /₀ y G α_q /₁₁. GPR120 es expresado en intestino, adipocitos, papilas gustativas, monocitos y pulmón, este receptor puede ser activado por ácidos grasos constituidos por una cadena de 14 a 18 carbonos y por ácidos grasos saturados con una longitud de 16 a 22 carbonos, así como es un receptor acoplado a proteínas G α q/11 (*39*). Tanto los receptores FFAR1 y GPR120 se expresan en líneas celulares de cáncer de mama y en células mamarias epiteliales humanas no transformadas. Así mismo el AO induce un incremento de la concentración de Ca²⁺ intracelular y la proliferación a través de una vía dependiente de FFAR1 en células de cáncer de mama (*40, 41*).

5.5 Ácido Araquidónico, COXs, LOXs y cáncer

El ácido araquidónico (AA), es un ácido graso omega-6 formado por una cadena de 20 átomos de carbono con cuatro dobles enlaces en las posiciones 5, 8,11 y 14 (42). El AA es un ácido graso abundante en los fosfolípidos de la membrana celular, siendo liberado desde la membrana en respuesta a diversos estímulos. Para su liberación intervienen tres mecanismos diferentes. El primero es catalizado por la fosfolipasa A₂, la cual a partir de los glicerofosfolípidos libera AA y un lisofosfolípido. En el segundo mecanismo interviene la fosfolipasa C, la cual rompe la unión éster-fosfato en el fosfolípido para producir 1,2 -diacilglicerol, el cual sirve como sustrato para generar AA y glicerol. El tercer mecanismo es mediado por la fosfolipasa D, la cual hidroliza fosfatidil colina generando ácido fosfatídico y colina, el cual sirve como precursor de diacilglicerol o AA, mediante la acción enzimática de fosfatidato fosfohidrolasa (43-45). El AA es metabolizado por: (1) ciclooxigenasas (COX), las cuales generan la producción de prostaglandinas (PG); (2) lipoxigenasas (LOX), las cuales forman ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETES) y leucotrienos (LT); (3) citocromo P450s, los cuales catalizan la formación de ácidos epoxieicos atrienoicos (EETs) o la formación de HETEs (Figura.1) (46).

En células cancerosas se ha observado que se encuentran expresadas ciclooxigenasas y lipoxigenasas, las cuales se encuentran regulando crecimiento celular, sobrevivencia, migración e invasión. De manera general se ha sugerido que 5-LOX y 12-LOX favorecen carcinogénesis, mientras que 15-LOX-2 tiene un efecto anticancerígeno y el papel de 15-LOX-1 está en controversia (*47*). En cuanto a las enzimas COX, COX-2 la cual es una enzima inducible es sobre expresada en cáncer de estómago, esófago, hígado, páncreas, cabeza y cuello, pulmón, mama, próstata y vejiga. El incremente en la expresión de COX-2 se ha relacionado con una disminución en la sobrevivencia de los pacientes con cáncer, mientras que COX1, se ha observado sobre expresada en cáncer de ovario (*48*).



Figura.1. Eicosanoides bioactivos derivados de ácido araquidónico. El ácido araquidónico es metabolizado por tres vías, la vía de ciclooxigensas, lipoxigenasas y citocromo P450. En el esquema los principales mediadores y sus metabolitos se muestran en azul, las enzimas en negro, el papel biológico en verde, inhibidores en óvalos rojos y agonistas en óvalos verdes. Ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), enzimas citocromo P450 (CYP), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina PGI₂, leucotrieno A₄ (LTA₄), ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHET), 20-hidroxiprostaglandina E₂ (20-OH PGE₂). Figura modificada de (*49*).

5.6 12-LOX y cáncer

La enzima 12-LOX utiliza el AA para sintetizar ácido 12hidroperoxieicosatetraenoico (12-HPETE), el cual es convertido en ácido 12hidroxieicosatetraenoico (12-HETE) (*50*). En humanos el GPR31 es un receptor acoplado a proteínas G de alta afinidad para 12-HETE (*51*). La enzima 12-LOX tiene tres isoformas: plaquetaria, leucocitaria y epidérmica. La isoforma plaquetaria generalmente está ausente en epitelio normal, puede ser inducida por estímulos pro inflamatorios y frecuentemente esta constitutivamente expresada en varios canceres incluyendo cáncer de colon, esófago, pulmón, próstata y cáncer de mamá (*46*). Así mismo niveles elevados de RNAm de 12-LOX correlaciona positivamente con estados avanzados de cáncer de próstata (*50*); mientras que la inhibición de 12-LOX bloquea la proliferación e induce apoptosis en células de carcinoma de próstata. Por otro lado, 12-HETE está involucrado en proliferación y sobrevivencia en células de cáncer, incluyendo cáncer de ovario, mama y próstata, además tiene un papel crítico en motilidad celular, invasión y angiogénesis (*42*).

Estudios *in vitro* han mostrado que el metabolismo de las enzimas lipoxigenasas está involucrado en la regulación de la adhesión celular en células tumorales. En la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435 la inhibición de la actividad de lipoxigenasas reduce dramáticamente la adhesión de estas células al colágeno IV (*52*). Por otro lado en la línea celular humana de cáncer de mama MCF-7, 12-HETE tiene la habilidad de mediar el efecto proliferativo del estrógeno y el ácido linoleico (*53*).

5.7 Vía de señalización fosfatidil inositol 3-cinasa/Akt y cáncer de mama

Alteraciones de vías de señalización que regulan crecimiento, proliferación y apoptosis son centrales en el cáncer de mama. La activación de la vía PI3K/Akt tiene un papel muy importante en la regulación del crecimiento celular en el cáncer de mama maligno (*54*). Las fosfoinositol 3-cinasas (PI3Ks) son cinasas de lípidos divididas en tres clases de acuerdo a la homología de secuencias, preferencia de sustratos y distribución en los tejidos. La clase I de PI3Ks se dividen en clase IA y IB, siendo la primera la más frecuentemente implicada en cáncer. La subunidad catalítica p110α y su subunidad reguladora p85 de la clase IA están relacionados fuertemente con la regulación de la división celular y tumorígenesis (*55*).

La activación de la vía PI3K puede ocurrir en respuesta a una gran variedad de señales extracelulares a través de receptores tales como receptores de factores de

crecimiento y de integrinas. Los receptores median la activación de la vía PI3K mediante el reclutamiento de la subunidad reguladora p85 de PI3K a través de su dominio de homología a Src 2 (SH2) que se une a residuos fosfotirosina localizados en el receptor. Una vez en la membrana, la subunidad catalítica p110 de PI3K fosforila a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en la posición 3' generando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). El resultante PIP3 recluta proteínas que contienen el dominio de unión a la membrana plasmática particularmente Akt y la cinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK1) mediante sus dominios de homología a plekstrina (PH). A continuación PDK1 fosforila a Akt1 en la treonina 308 que se encuentra en el dominio catalítico. Para que Akt1 se active totalmente, es necesario que sea fosforilada por una segunda cinasa (PDK2) en un segundo sitio (serina 473) presente en su región reguladora carboxilo terminal (*56, 57*).

Akt es una cinasa de serina y treonina, su familia consiste de tres miembros: Akt1/PKBα, Akt2/PKBβ y Akt3/PKBγ. Todos los miembros comparten una estructura similar, tienen un dominio de homología a plekstrina N-terminal, un dominio de unión, un dominio de cinasa y un dominio hidrofóbico C- terminal (DH) (*58*). Akt es activada por fosforilación en dos sitios, uno se encuentra en el dominio catalítico (treonina 308, treonina 309, treonina 305 en Akt1, Akt2 y Akt3 respectivamente) y el otro sitio de fosforilación se encuentra en el dominio DH (serina 473, serina 474, serina 472 en Akt1, Akt2 y Akt3 respectivamente) (*59*). El C- terminal de la variante de Akt3, carece de la porción del DH que contiene las serina 473, serina 474 o la serina 472 presentes en las otras isoformas (figura.2) (*60*).



Figura. 2. Comparación de la estructura de dominios de las isoformas de Akt en humano. En el hombre existen 3 isoformas de Akt que comparten aproximadamente el 80% de homología de su secuencia de aminoácidos, Akt3 tiene una variante la cual tiene un dominio hidrofóbico truncado y es designada como "Akt3-(y1)" (60).

La activación de Akt estimula la progresión del ciclo celular, sobrevivencia, metabolismo y migración celular a través de la fosforilación de diversos sustratos fisiológicos. Diversos estudios realizados usando dos modelos de ratones transgénicos demostraron que Akt1 tiene un papel importante en la inducción de cáncer de mama, mientras que Akt2 está principalmente involucrada en metástasis. En la motilidad e invasión celular, el papel específico de cada miembro de la familia de Akt, parece depender en gran medida del tipo celular que se estudie. En cáncer de mama y ovario se demostró que la sobrexpresión de Akt2 sobre-regula a las integrinas β 1 e incrementa la invasión *in vitro* así como la metástasis *in vivo* (*61, 62*).

5.8 Factor nuclear – κB (NF- κB) y cáncer

NF-κB es un factor de transcripción importante en la integración de múltiples respuestas a estímulos de estrés, inflamación, regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa (*63*). Los factores de transcripción NF-κB de mamíferos consisten de 5 subunidades homólogas (RelA/p65, cRel, RelB, p50/NF-κB1 y p52/NF-κB2) los cuales dimerizan y se mantienen en el citoplasma por los inhibidores de NF-κBs (IκBs). Rio arriba del IκB unido a los dimeros de NF-κB está el complejo IκB cinasa (IKK), el cual está compuesto de dos subunidades catalíticas (IKKα y IKKβ) y una subunidad reguladora (IKKγ/NEMO) (*64*).

De acuerdo a Hanahan y Weinberg, la tumorigénesis requiere de seis alteraciones importantes en la fisiología de una célula normal: ser autosuficientes en señales de crecimiento, ser insensible a la inhibición de crecimiento, evasión de apoptosis, inmortalización, angiogénesis sostenida, invasión y metástasis (*65*). NF-κB es capaz de inducir varias de estas alteraciones celulares y se ha encontrado constitutivamente activo en algunos tipos de células cancerosas incluyendo células de tumor de Hodgkin (*66*).

Se han descrito mecanismos específicos mediante los cuales NF- κB influye en la iniciación, promoción y progresión de cáncer (*67*), su activación en cáncer puede ser resultado de la exposición a estímulos proinflamatorios en el microambiente del tumor o de la activación mutacional de componentes rio arriba de la vía de señalización IKK-NF-κB (*68*). La promoción de crecimiento celular es una característica necesaria de cualquier cáncer y puede llevarse a cabo a través de la activación anormal o desregulación de vías de señalización involucradas en la regularización del ciclo celular. NF-κB tiene como blanco genes que regulan proliferación celular incluyendo ciclina D1, ciclina E, CDK2 y c-Myc; otros genes blanco son GM-CSF e interleucina-6 (IL-6) (*69*). Así mismo, regula genes que inhiben apoptosis (siendo la apoptosis un mecanismo por el cual el sistema inmune y los mecanismos de vigilancia genómica pueden eliminar células premalignas o malignas). Algunos de estos genes son miembros de la familia Bcl2 tales como Bcl-

xl, inhibidores de apoptosis (IAPs) y cFLIP(*63*). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de Bcl2 por NF-κB en cáncer de mama promueve transición epitelio mesénquima (EMT) (*70*). NF-κB también se ha visto implicado en el proceso de angiogénesis, el cual es esencial para la progresión y crecimiento de la masa del tumor (*71*). Esto es debido a que citosinas inflamatorias tales como TNFα, IL-1 e IL-6 reguladas por NF-κB, estimulan la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uno de los principales reguladores de angiogénesis y de otros reguladores angiogénicos tales como CXCL 1, 8 y la IL-8 (*72*).

5.9 Migración, invasión y metástasis de células tumorales

La migración celular es una etapa determinante en el proceso de metástasis, durante la migración, el citoesqueleto (microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina) es el responsable de brindar la infraestructura necesaria para que este proceso se lleve a cabo. Particularmente, el citoesqueleto de actina es el que regula la dinámica de la migración. En células cancerosas, los filamentos de actina se encuentran formando haces, los cuales forman lamelipodia, filopodia e invadopodia (*73*). La figura 3, el modelo de la motilidad celular con la formación del lamellipodium en la dirección del movimiento, la membrana líder es entonces anclada mediante adhesiones focales nacientes. Las etapas siguientes son la contracción de las fibras de estrés de actina fibrilar, las cuales generan la tensión necesaria para arrastrar a la célula hacia adelante y desensamblar las adhesiones en la parte posterior de la célula. Durante el movimiento celular, la endocitosis y el reciclaje de moléculas tales como E-caderina, integrinas y receptores para factores de crecimiento juegan un papel muy importante en la motilidad celular(*74*).



Figura. 3. Modelo de motilidad celular. El lamelipodio se forma en el borde líder de las células cancerosas que están migrando, después de la activación por un estímulo extracelular. La activación de PI3K en respuesta a factores de crecimiento resulta en la acumulación de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, el cual estimula a RAC y Cdc42, estas inducen la formación de protrusiones en el borde líder, los filopodios son inducidos por Cdc42, los lamelipodios por Rac1 y las fibras de estrés por RhoA (*73*).

La metástasis, por lo tanto es el resultado de una sucesión compleja de eventos biológicos, en donde las células cancerosas del tumor primario tienen que invadir localmente. Para lograrlo las células tienen que atravesar la matriz extracelular y las capas de células del estroma que las rodea, intravasarse en vasos sanguíneos, sobrevivir al transporte a través de la vasculatura. Posteriormente deben ser arrestadas en un órgano distante, extravasarse en el parénquima de tejidos distantes, adaptarse en este nuevo microambiente para poder formar micro metástasis y reiniciar su programa de proliferación celular en este sitio metastásico. Generando crecimientos neoplásicos macroscópicos detectables clínicamente, a este proceso también se le denomina colonización metastásica (Figura 4) (*75*).



Figura. 4. Metástasis. La metástasis clínicamente detectable es el producto final de una serie compleja de procesos biológicos. Durante la progresión de la metástasis, células tumorales salen del tumor primario (invasión local, intravasación), se relocalizan sistémicamente (sobrevivencia en la circulación, arresto en un órgano distante, extravasación) y se adaptan a al microambiente de tejidos distantes (formación de micro metástasis, colonización metastásica) (*75*).

6 Justificación

En México el cáncer de mama representa la principal causa de muerte en la población femenina (11). Estudios epidemiológicos y estudios experimentales muestran una asociación entre una dieta rica en ácidos grasos y la incidencia de cáncer de mama (41, 76). Sin embargo, las vías de señalización que están mediando el efecto de los ácidos grasos, en células de cáncer de mama, aún no están dilucidadas. Por ello, es importante estudiar los mecanismos moleculares mediante los cuales, el AO le confiere a las células tumorales la capacidad de migrar e invadir.

7 Hipótesis

El AO induce migración e invasión por medio de una vía dependiente de GPR40, GPR120 y PI3K/Akt2 en células cancerosas mamarias.

8 Objetivos

8.1 Objetivo general

 Estudiar el papel de GPR40, GPR120, GPR31, PI3K, Akt y 12-LOX en los procesos de migración e invasión inducidos por ácido oleico en células de cáncer de mama.

8.2 Objetivos específicos

- Determinar la participación del receptor GPR40 y GPR120 en la señalización del AO.
- Evaluar la participación de PI3K/Akt en los procesos de migración e invasión.
- Determinar si el AO induce la activación de Akt2 y NF-κB.
- Evaluar la participación de EGFR en la migración celular.
- Determinar la participación de 12-LOX en el proceso de migración inducido por AO.
- Determinar la participación de 12-LOX en la formación de contactos focales.
- Evaluar el papel de 12-LOX en la activación de Akt2 y FAK.
- Determinar la participación del receptor GPR31 en el proceso de migración celular.
- Evaluar si el AO incrementa la expresión del receptor GPR31.

9 Materiales y métodos

9.1 Material biológico

En este estudio se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231, la cual es una línea celular humana invasiva de cáncer de mama. Línea celular HUVEC: son células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano. La línea celular MCF-7, la cual es una celular humana no invasiva de cáncer de mama.

9.2 Anticuerpos

Los anticuerpos Anti-Akt2 (F-7) y anti-FAK (C-20), el anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa HRP sc-2030, el anticuerpo anti-12-LOX, el anticuerpo anti GPR3, fueron adquiridos de santa cruz biotecnology (Santa Cruz CA, USA); el anticuerpo anti-p-FAK-Tyr397, el anticuerpo monoclonal anti-p-Akt-Tthr308 (244F9) y el anticuerpo anti-GPR120, fueron adquiridos de Cell Signaling (Danvers, MA); el anticuerpo monoclonal anti-paxilina; el anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón acoplado a peroxidase HRP 115-035-003, fue adquirido de Jackson Immuno Research; anti-actina fue donado por el Dr. Manuel Hernandez (Cinvestav-IPN), el anticuerpo Anti-ratón-FITC 81-6511, adquirido de Zymed Laboratorios.

9.3 Inhidores, siRNAs

El inhibidor de PI3K wortmanina 681675, el inhibidor de EGFR AG1478, fue adquirido de Calbiochem; el inhibidor de PI3K LY294002 sc-201426, fueron adquiridos de santa cruz biotecnology (Santa Cruz CA, USA); los inhibidores baicalein (BAI) y A6730 fue adquirido de Sigma (St. Louis, MO); AH7614 fue adquirido de Tocris Bioscience; DC260126 fue adquirido de BD Biosciences.

9.4 Otros materiales

Ácido oleico proveedor Sigma (St. Louis, MO); $[\gamma^{-32}P]$ ATP fue adquirido de Perkin-Elmer (Boston, MA); BD Matrigel fue adquirido de BD Biosciences (Bedford, MA).

9.5 Cultivo celular

La células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos, en una atmosfera húmeda conteniendo 5 % de CO₂ y aire a 37 °C. Para propósitos experimentales, los cultivos fueron ayunados durante 24 h antes del tratamiento con inhibidores y/o con AO. Células HUVEC fueron cultivadas en DMEM al 10% SFB y fueron ayunadas durante 18 h.

9.6 Preparación de la solución de AO

La solución de AO fue preparada con albumina sérica (ASB). Brevemente, la unión de AO a bovina ASB (ASB-AO) fue preparada calentando AO a 37 °C con 5% de ASB libre de ácidos grasos. La solución fue ajustada a un pH de 7.4 y filtrada usando un filtro de 0.22 μ M.

9.7 Estimulación con AO

Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 se mantuvieron en medio sin suero durante 24 h previas a la estimulación. El estímulo se realizó con AO 100 µM, por el tiempo requerido. Para finalizar, la estimulación, el medio fue aspirado y las células fueron solubilizadas en 0.5 ml de buffer RIPA (ortovanadato de sodio 1 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 10 mM, glicerol 10%, Triron X-100 1%, HEPES 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 1.5 mM, EGTA 1 mM, SDS 0.1%, PMSF 1 mM y desoxicolato de sodio 1%, pH 7.4) a 4 °C. Los extractos se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min.

9.8 Inmunoprecipitación

Los lisados celulares fueron centrifugados a 12,000 rpm a 4 °C por 10 min. Se recolecto el sobrenadante y las proteínas fueron inmunoprecipitadas durante toda la noche a 4 °C con proteína A-agarosa unida al anticuerpo anti-Akt2. Los inmunoprecipitados fueron lavados tres veces con RIPA.

9.9 Ensayo de western blot

Cantidades iguales de proteína fueron separadas por SDS-PAGE usando un gel separador al 10%. En seguida fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada con leche al 3% en PBS pH 7.2 por 1 h e incubada toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Las membranas fueron lavadas tres veces con PBS al 0.1% Tween 20 y enseguida incubadas por 2 h con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa HRP de rábano. Las membranas fueron lavadas con PBS 0.1% Tween 20 y las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas en una placa radiográfica usando el reactivo ECL.

9.10 Cuantificación de 12-HETE

Los cultivos de células MDA-MB-231 fueron tratados con 100 μ M de AO o 15 μ M de AA por 30 min y los medios fueron recolectados. La concentración de 12-HETE en los medios recolectados se cuantifico usando un kit para ELISA, adquirido de Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA. El ensayo se realizó de acuerdo al manual de manufactura.

9.11 Medios condicionados

Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados con AO 100 µM por 10 min, 30 min, 1 h, 18h, 20 h y como control positivo SFB 10% por 20 h. Al terminar el tratamiento don AO los medios fueron recuperados y refrigerados a -20°C para ser utilizados en experimentos posteriores.

9.12 Obtención de extractos nucleares

Los cultivos celulares fueron resuspendidos en 500 µl de buffer de lisis hipotónico (Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl2 6 mM, NaF 10 mM, Na3VO4 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM) e incubadas por 10 min a 4 °C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 2600 rpm a 4 °C por 15 min, el sobrenadante fue retirado, los núcleos fueron lavados dos veces con buffer hipotónico, con la finalidad de remover el material citoplasmático residual. Las proteínas contenidas en el núcleo se extrajeron mediante la adición de 20 µl de buffer hipertónico (HEPES 20 mM, NaCl₂ 420 mM, MgCl2 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM y 25% de glicerol) con agitación vigorosa por 15 min y finalmente fueron centrifugadas por 15 min a 12,000 rpm, recuperándose el sobrenadante el cual contenía las proteínas nucleares.

9.13 Ensayos de retardo de entrada al gel (EMSA)

Se utilizaron 20 pmol de un oligonucleótido de doble cadena, el cual contenía sitios de unión específicos para NF- κ B como sonda 5'-AGCTAAGGGACTTTCCGC TGGGGACTTTCCAGG-3' '5-AGCTCCTGGAAAGTCCCCACGGAAAGTCCCTT-3'. La sonda fue marcada con ATP (γ -P³²) utilizando T4 polinucleotido cinasa. Aproximadamente 1 pg del oligonucleótido marcado fue incubado con 5 µg de extracto nuclear en una mezcla de reacción que contenía 3 µg de poly (dl-dC), HEPES 0.25 M pH 7.5, KCl 0.6 M, MgCl₂ 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 7.5 mM y glicerol al 9% por 20 min. Se utilizó un exceso de la misma sonda no marcada como control de competencia específico y un oligonucleótido irrelevante como

competidor no específico. Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 6% en solución amortiguadora de Tris borato-EDTA 0.5X, los geles fueron secados y analizados por autorradiografía.

9.14 Ensayo de migración por cierre de herida

Los ensayos de migración por cierre de herida se realizaron utilizando cultivos celulares en cajas de 35 mm al 100% de confluencia, los cuales fueron ayunados por 24 h en medio DMEM sin suero. El medio fue aspirado, lavado dos veces con PBS 1X y las células fueron pretratadas por 2 h con mitomicina C, a una concentración final de 12 µM. La ralladura fue realizada utilizando una punta para pipeta automática de 200 µl, posteriormente se hicieron dos lavados con PBS 1X y nuevamente se adiciono medio DMEM sin suero. A continuación se llevó a cabo la estimulación o inhibición, según fuese requerido. Como control positivo, las células fueron estimuladas con medio DMEM con suero al 10%.

9.15 Microscopía confocal

Células MDA-MB-231 fueron sembradas en cubreobjetos. Posteriormente fueron ayunadas por 24 h en medio DMEM sin suero. Fueron estimuladas con AO o fueron tratadas con inhibidores, según fuese requerido. Después fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 10 min, fueron permeabilizadas con triton 0.5% durante 15 min y bloqueadas 1 h con SFB al 10% en PBS. Para teñir contactos focales, las células fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo anti-paxilina a 4°C y posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a FITC durante 2 h a temperatura ambiente. Para la tinción de fibras de estrés se usó faloidina rodaminada. Las células se observaron mediante un microscopio confocal Leica.

9.16 Ensayo de invasión en cámara de Boyden y matrigel

Los ensayos de invasión fueron llevados a cabo en cámaras de Boyden. Las cámaras contienen un filtro con poros que miden 0.8 μ M de diámetro, para cubrir estos poros se colocaron 50 μ l de Matrigel BD 3 mg/ml sobre los filtros. Se usaron células MDA-MB-231 cultivadas hasta confluencia y ayunadas por 24 h. Posteriormente fueron resuspendidas, utilizando tripsina al 0.25% y medio DMEM sin suero. Fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer y posteriormente se colocaron 100,000 células en la parte superior de la cámara de Boyden. En la parte inferior de la cámara se colocaron 600 μ l de DMEM sin suero como control negativo y DMEM sin suero conteniendo AO 100 μ M como control positivo. Los inhibidores utilizados, fueron añadidos a las células 1 h antes de iniciar el experimento y permanecieron a lo largo de todo el experimento.

Las cámaras posteriormente fueron incubadas por 48 h a 37 °C y 5% de CO₂, después de este tiempo las células fueron fijadas con metanol frío, las que no invadieron fueron retiradas de la parte superior de la membrana empleando un hisopo de algodón, las células presentes en la parte inferior de la membrana fueron teñidas con cristal violeta al 1% por 10 min. Para cuantificar el número de células que invadieron, las células adheridas y teñidas fueron solubilizadas en 200 µl de ácido acético al 10%, finalmente su absorbancia fue medida a 600 nm.

9.17 Transfección de RNAs de interferencia

El silenciamiento de Akt2, 12-LOX y GPR31 en células MDA-MB-231 se realizó usando los siRNAs específicos. Se incluyó un siRNA control, adquirido santa cruz biotecnology (Santa Cruz CA, USA).
9.18 PCR en tiempo real

Células MDA-MB-231 fueron tratadas con AO 100 μ M por 24 h y el ARN total fue aislado por trizol. Se utilizó el kit Quantitec reverse transcription, adquirido de Quiagen, para la síntesis del cDNA, utilizando 1 μ g de ARN total. Para la PCR se utilizó 1 μ l de cDNA y el iQ SYBER Green Supermix, adquirido de Bio-RAD Laboratories. Los primers que se utilizaron para la amplificación de GPR31 fueron: 5'-CACGGCCGGGTGATGCCATTCCCA-3' y 5'-GTCAGGAATAGGAGTCTCTG GGGTTG-3'. Y para la amplificación de β -actina los primers fueron: 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3' y 5'AGCACTGTGTTG GCGTACAG-3' Las condiciones para la amplificación fueron: 10 min a 95°C, 35 ciclos (30s a 94°C, 30s a 53°C y 2 min a 72°C) y para finalizar 7 min a 72°C. Los resultados serán analizados por el método 2^{- $\Delta\Delta$ CT} y normalizados con los datos de β -actina.

9.19 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando ANOVA de una vía. Los resultados expresan la media de ± SD.

10. Resultados

El AO induce migración en células MDA-MB-231 de manera dependiente de la dosis

El conocimiento que se tiene sobre el efecto inductor de migración en células de cáncer de mama estimuladas por AO está pobremente descrito. Por lo cual decidimos investigar si el AO es capaz de inducir migración. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados con 12 μ M de mitomicina C por 2 h. Se realizó una ralladura con una punta para pipeta automática de 200 μ l y se trataron por 48 h con diversas concentraciones de AO. Como se muestra en la figura 5, las células MDA-MB-231 que fueron estimuladas con AO mostraron un incremento en la migración comparando con células no tratadas, pudiéndose apreciar un pico máximo con 100 μ M de AO. Con base en este resultado decidimos utilizar la concentración de 100 μ M de AO en todos los experimentos que se realizaron.

GPR40 participa en la regulación de la migración inducida por el AO en células MDA-MB-231

Resultados previos en nuestro grupo de trabajo, demostraron que el AO induce migración de células MDA-MB-231(77). Por ello se evaluó el papel de GPR40 en el proceso de migración celular inducida por AO. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron tratados con DC260126 3 μ M por 1h, el cual es un antagonista de GPR120 (78), se realizó la ralladura y las células fueron estimuladas con AO 100 μ M por 48 h. Como se observa en la figura 6, el tratamiento con DC260126 inhibió la migración inducida por el AO in células MDA-MB-231.



Figura. 5. El AO induce migración en células MDA-MB-231 de manera dependiente de la dosis. Cultivos confluentes de la línea celular MDA-MB-231 fueron ayunados por 24 h y tratados por 2 h con mitomicina C. Se realizó la ralladura y se estimuló con diferentes concentraciones de AO por 48 h. A) la imagen muestra una curva dosis respuesta de células MDA-MB-231 tratadas con 0 a 200 μ M de AO. B) Gráfica del análisis estadístico y densitométrico de los resultados de tres experimentos independientes. Los resultados están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística (*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001) por ANOVA de una vía.



Figura. 6. GPR40 participa en la regulación de la migración celular inducida por AO en células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas (+) o no (-) con DC260126 3 μ M, se realizó la ralladura y se estimularon con AO 100 μ M por 48 h. A) La figura muestra la imagen representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) Grafica del análisis estadístico y densitométrico de al menos tres experimentos independientes. (*** P<0.001) por ANOVA de una vía.

GPR120 participa en la migración celular inducida por AO

Para determinar el papel del receptor GPR120 en la migración celular inducida por el AO, se utilizaron cultivos de células MDA-MB-231 las cuales estaban transfectadas con un shRNA específico contra GPR120 o con un shRNA scramble.

El efecto del shRNA específico para GPR120 sobre la expresión de este receptor, se evaluó mediante Western Blot. Posteriormente se hizo la ralladura y las células fueron tratadas por 48 h con AO 100 µM, como control positivo las ´celulas fueron estimuladas con medio DMEM con suero al 10%. Los resultados mostraron que la migración celular inducida por AO es parcialmente dependiente de la expresión de GPR120 en células MDA-MB-23, como se muestra en la figura 7.

El AO promueve migración celular en células MCF-7 de manera dependiente de GPR40 y GPR120.

Debido a que el AO induce migración en células MCF-7 (*79*). Se evaluó, si la migración celular inducida por el AO en las células MCF-7, requiere de la participación de GPR40 y GPR120. Cultivos celulares fueron tratados por una hora con DC260126 3 μ M o AH7614 10 μ M los cuales son antagonistas de GPR40 y GPR120, respectivamente (*80*). Se realizó la ralladura y las células fueron estimuladas con AO 100 μ M por 48 h. Como se observa en la figura 8, el tratamiento con DC260126 y AH7614 previno la migración inducida por el AO en células MCF-7.

El AO promueve la activación de Akt2.

Diversos estudios han sugerido que en células epiteliales de mama Akt2, una cinasa serina / treonina que se encuentra rio debajo de PI3K, tiene un efecto promigratorio (*54*).Por ello se analizó si el AO induce la activación de Akt2 en células MDA-MB-231. Lisados de células estimuladas con 100 μ M de AO a diferentes tiempos fueron analizados por Western Blot, la activación de Akt2 fue determinada por su fosforilación en la treonina 309, empleando un anticuerpo que reconoce este residuo (anti p-Akt2 Thr 309). En la figura 9, se ilustra que el estímulo con AO induce un incremento en la activación de Akt2 de manera dependiente del tiempo, teniendo un pico máximo de activación entre 20 y 30 min.





Cultivos de células MDA-MB-231 transfectadas con un shRNA específico para GPR120 o un shRNA control se les realizó la ralladura y fueron estimuladas con 100 µM de AO por 48 h. A) La figura muestra la imagen representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) La figura muestra la imagen representativa del Western Blot mediante el cual se analizó la expresión de GPR120. C) Grafica del análisis estadístico y densitométrico de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan la significancia estadística (**P <0.01, ***P <0.001) por ANOVA de una vía.



Figura. 8. El AO promueve migración en células MCF-7 de manera dependiente de GPR40 y GPR120. Células MCF-7 fueron pretratadas (+) o no (-) con DC260126 3 μ M o AH7614 10 μ M por 1h. Se realizó la ralladura y se estimularon con AO 100 μ M por 48 h. A) La figura muestra la imagen representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) Grafica del análisis estadístico y densitométrico de al menos tres experimentos independientes. (*P <0.05, **P <0.01) por ANOVA de una vía.

A) IP: Akt2 WB p-Akt2 Thr 309



Figura.9. El AO promueve la activación de Akt2. Cultivos confluentes de células MDA-MB-321 fueron estimulados con 100 μ M de AO por 0, 3, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min. Se obtuvieron extractos totales de proteínas y se analizó la fosforilación de Akt2, mediante IP con anti-Akt2. Posteriormente, se relizó inmunoblot utilizando un anticuerpo monoclonal anti p-Akt2 Thr 309. La membrana fue reprobada con un anticuerpo anti-Akt2. A) Cinética de fosforilación de Akt2 en la línea celular MDA-MB-231 estimulada con AO. B) Gráfica del análisis estadístico y densitométrico de tres experimentos independientes. Los valores están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística (*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001) por ANOVA de una vía.

La migración celular inducida por AO es dependiente de la activación de PI3K y Akt2 en células MDA-MB-231.

Para determinar si la vía de señalización PI3K/Akt2 está involucrada en la activación del proceso de migración celular, se realizaron ensayos de migración por cierre de herida. Células MDA-MB-231 fueron tratadas con LY294002 10 μ M (inhibidor de PI3K) o A6730 2 μ M (inhibidor de Akt) por 1 h, posteriormente se estimularon con 100 μ M de AO por 48h. Como se muestra en la figura 10, el tratamiento con LY294002 y el tratamiento con A6730 inhiben significativamente la migración celular.

A) Control Control



B)

Figura 10. La migración celular inducida por AO es dependiente de la activación de PI3K y Akt2 en células MDA-MB-231. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron ayunados por 24 h y tratados por 2 h con mitomicina C, pretratados con LY294002 o A6730 por 1 h. Se realizó una ralladura y posteriormente se estimuló con 100 μM de AO por 48 h. A) La figura muestra la imagen representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) Grafica del análisis estadístico y densitométrico de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan la significancia estadística (**P <0.01, ***P <0.001) por ANOVA de una vía.

El AO induce migración a través de una vía dependiente de Akt2.

Para determinar la participación de Akt2 en la señalización del AO, células MDA-MB-231 fueron transfectadas con un siRNA específico para Akt2 o un siRNA scramble, se hizo la ralladura y las células fueron tratadas por 48 h con AO 100 μM. Los resultados mostraron que la migración celular inducida por AO es dependiente de la expresión de Akt2 en células MDA-MB-231 (figura 11).

En células MCF-7 la migración celular inducida por AO es dependiente de la activación de PI3K y Akt2.

Resultados previos mostraron que el AO indujo migración celular en células MCF-7. Se examinó la participación de PI3K y Akt2 en la migración celular. Cultivos celulares fueron tratados por 1 h con A6730 2 μ M o LY294002 10 μ M, posteriormente se hizo la ralladura y las células fueron tratadas por 48 h con AO 100 μ M. Los resultados mostraron que en células MCF-7 el AO induce migración celular mediante una vía dependiente de PI3K y Akt2 (Figura 12).

Papel de PI3K en la formación de contactos focales.

Tomando en cuenta el resultado mostrado en la figura 10. Se evaluó la participación de PI3K en la formación de contactos focales. Células MDA-MB-231 crecidas en cubreobjetos fueron pretratadas con LY294002 por 1 h y estimuladas con 100 µM de AO. Posteriormente se realizó la tinción de contactos focales usando un anticuerpo anti-paxilina y un anticuerpo secundario marcado con FITC, para visualizarlos mediante microscopia confocal. Como se ilustra en la figura 13, la inhibición de PI3K incremento el tamaño de los contactos focales que se formaron por el estímulo con AO.

El AO induce invasión en la línea celular MDA-MB-231 por medio de un mecanismo dependiente de la activación de PI3K y Akt.

Puesto que el AO induce migración celular de manera dependiente de la activación de PI3K y Akt, tal como se observa en la figura 10. Se estudió si el AO induce invasión y si en este proceso participan las cinasas PI3K y Akt. Células MDA-MB-231 fueron tratadas con LY294002 10 µM o A6730 2 µM por 1 h, después las células fueron colocadas en la cámara de Boyden recubierta con Matrigel BD y estimuladas con 100 µM de AO por 48 h. Para cuantificar la invasión, las células fueron fijadas, teñidas y solubilizadas en ácido acético al 10% y la absorbancia fue medida a 600 nm. Como se muestra en la figura 14, las células que fueron estimuladas con AO mostraron capacidad de invasión estadísticamente significativa; mientras que el tratamiento con LY294002 y A6730 abatió completamente la invasión celular.





Cultivos de células fueron ayunados durante 12 h con medio sin suero sin antibiótico, transfectadas con un siRNA específico para Akt2 o un siRNA scramble. Se realizó la ralladura y fueron estimuladas con 100 µM de AO por 48 h. A) La figura muestra la imagen representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) La figura muestra la imagen representativa del Wertern Blot mediante el cual se analizó la expresión de Akt2. C) Grafica del análisis estadístico y densitométrico de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan la significancia estadística (***P <0.001) por ANOVA de una vía.



Figura. 12. En células MCF-7 la migración celular inducida por AO es dependiente de la activación de PI3K y Akt2. Las células fueron ayunadas por 18 h y tratadas con mitomicina C, pretratados con LY294002 o A6730 por 1 h, se realizó una ralladura y posteriormente se estimuló con 100 μ M de AO por 48 h. A) La figura muestra la imagen representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) Grafica del análisis estadístico y densitométrico de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan la significancia estadística (**P <0.01) por ANOVA de una vía.



Figura 13. Papel de PI3K en la formación de contactos focales. A) Células MDA-MB-231 fueron ayunadas, pretratadas con el inhibidor de PI3K (LY294002) por 1 h y estimuladas con 100 µM de AO por 15 min. Posteriormente, las muestras fueron fijadas, incubadas con anti-paxilina (marcador de contactos focales) durante toda la noche a 4°C. En seguida fueron incubadas con un anticuerpo secundario marcado con FITC (color verde) por 2 h y tratadas con faloidina rodaminada (color rojo) por 2 h para teñir actina fibrilar. La figura muestra las microscopias de cada condición experimental, donde se

observa que el estímulo incrementa la formación de los contactos focales y con el estímulo más la inhibición de PI3K estos se observan de mayor tamaño. B) gráfica del análisis estadístico y densitométrico de tres experimentos independientes. Los valores están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística (**P <0.01, ***P <0.001) por ANOVA de una vía.



Figura. 14. El AO induce invasión en la línea celular MDA-MB-231 de manera dependiente de la activación de PI3K y Akt2. Células MDA-MB-231 fueron tratadas por 1 h con LY294002 o A6730. Posteriormente fueron colocadas en la parte superior del matrigel y estimuladas con 100 μM de AO por 48 h. La invasión celular fue evaluada a las 48 h de estímulo. La gráfica representa el análisis estadístico de los resultados obtenidos de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan la significancia estadística (***P <0.001) por ANOVA de una vía.

La migración celular inducida por el AO en células MDA-MB-231 es dependiente de la actividad de EGFR.

Dado que el AO induce activación de Akt2 mediante la actividad de EGFR, se investigó si la señalización mediada por el receptor EGFR participa en la inducción de migración celular en respuesta al AO. Para ello ensayos de migración celular por cierre de herida fueron llevados a cabo. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron pretratadas con AG1478 500 nM por 30 min. En seguida se realizó la ralladura y se estimularon con 100 µM de AO durante 48 h. Como se ilustra en la figura 15, el pretratamiento con AG1478 inhibió significativamente la migración celular inducida por AO.

AO induce la activación de NF-κB en células MDA-MB-231 y MCF-7.

Puesto que algunos autores han reportado que este factor de transcripción modula diversos procesos incluyendo inhibición de apoptosis, estimulación de proliferación celular y promoción de migración e invasión celular, los cuales están asociados con progresión tumoral (*81*). Para determinar si NF-κB es activado en respuesta al AO decidimos realizar ensayos de EMSA. Para ello, extractos nucleares de células MDA-MB-231 y MCF-7 estimuladas con AO 100 µM a diferentes tiempos y 45 min respectivamente, fueron evaluados por EMSA usando una sonda marcada radioactivamente, la cual contenía sitios de unión a NF-κB. En la figura 16A, se muestra que la activación de NF-κB se incrementa mediante el estímulo con AO, el pico máximo lo podemos observar a 45 min ambas líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 (Figura 16B).

La activación de NF-KB inducida por el AO es dependiente de la actividad de PI3K, Akt y EGFR.

Debido al resultado previo, en donde se mostró que el AO induce un incremento en la translocación de NF-κB al núcleo, se evaluó la participación de PI3K, Akt1/2, y

EGFR en la translocación de NF- κ B al núcleo. MDA-MB-231 fueron tratadas con 10 μ M de LY294002, 2 μ M de A6730 o 500 nM de AG1478 y estimuladas con 100 μ M de AO por 45 min. Se obtuvieron extractos nucleares y fueron analizados por EMSA. Como se ilustra en la figura 17, el AO en células MDA-MB-231 induce un incremento en la activación de NF- κ B a través de una vía dependiente de la activación de PI3K, Akt1/2, y EGFR.



Figura. 15. La migración celular inducida por AO en células MDA-MB-231 es dependiente de la activación de EGFR. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron ayunados por 24 h y tratados por 2 h con mitomicina C. En seguida, las células fueron pretratadas por 30 min con el inhibidor AG1478, se realizó la ralladura y se estimularon con 100 µM de AO. A) Imagen representativa de tres experimentos

independientes. B) Gráfica del análisis estadístico y densitométrico de la migración celular inducida por el estímulo con AO en relación a la condición control y a la inhibición en relación al estímulo. Los asteriscos denotan la significancia estadística (***P <0.001) por ANOVA de una vía.



A) MDA-MB-231

Figura. 16. El AO induce la activación del factor de transcripción NF-κB en la línea celular MDA-MB-231 y MCF-7. Cultivos confluentes fueron estimulados con 100 μ M de AO por 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min, se obtuvieron extractos de proteínas nucleares y se analizó la capacidad de NF-κB de unirse al DNA mediante ensayos de EMSA,

empleando una sonda específica para NF- κ B radiomarcada P³². A) Muestra la cinética de unión de NF- κ B al DNA en células MDA-MB-231 estimuladas con AO. B) Cultivos confluentes de células MCF-7 fueron tratados o no con los inhibidores A6730 o LY294002 por una hora. Posteriormente fueron tratadas con 100 μ M de AO por 45 min. La capacidad de unión al DNA es observada como un retardo en el corrimiento de la sonda en el gel. Se muestra el resultado significativo de tres experimentos realizados de manera independiente.



Figura. 17. La activación de NF- κ B inducida por el AO es dependiente de la actividad de PI3K, Akt y EGFR. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron tratados con 10 μ M de LY294002 (A), 2 μ M de A6730 (B) o 500 nM de AG1478 (C). Posteriormente las células fueron estimuladas con 100 μ M de AO por 45 min y se obtuvieron extractos

nucleares. La actividad de NFκB fue analizada mediante el ensayo de EMSA. ***P <0.001.

La migración celular inducida por AO es dependiente de la vía de 12-LOX.

Estudios han demostrado que 12-LOX es expresada en diversos tumores, incluyendo cáncer de mama(*82, 83*). Se determinó si de manera específica 12-LOX regula la migración inducida por el AO. Para ello, células MDA-MB-231 fueron tratadas con baicalein, el cual es un inhibidor de la actividad de 12-LOX (*84*). Los cultivos de células MDA-MB-231 fueron tratados con 20 µM de baicalein por 24 h y estimulados con 100 µM de AO por 48 h. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con baicalein inhibió la migración celular inducida por el AO (figura 18). Para corroborar este resultado se utilizó un siRNA específico para 12-LOX. Células MDA-MB-231 fueron transfectadas con este siRNA específico para 12-LOX o un siRNA scramble, se hizo la ralladura y las células fueron tratadas por 48 h con AO 100 µM. Los resultados confirmaron que la migración celular inducida por AO es dependiente de la expresión de 12-LOX en células MDA-MB-231 figura 19. El papel de 12-LOX en la migración inducida por el AO, también fue evaluada en células MCF-7. Cultivos confluentes fueron tratados por 24 h con baicalein, se hizo

la ralladura y las células fueron tratadas por 48 h con AO 100 μ M. Como se muestra en la figura 20. El tratamiento con baicalein inhibió la migración celular inducida por AO.

La vía de 12-LOX regula la activación de Akt2 y FAK

Debido a que Akt2 y FAK son proteínas claves en la regulación de la migración celular, se evaluó el papel de 12-LOX en la activación de estas proteínas. Células MDA-MB-231 fueron ayunadas durante 24 h, tratadas con baicalein por 24 h y estimuladas con 100 µM de AO por 20 min para evaluar activación de Akt2 y por 10 min para evaluar activación de FAK. Se obtuvieron lisados celulares, los cuales

fueron analizados por western blotting utilizando un anticuerpo dirigido contra la Thr-309 fosforilada de Akt2 o un anticuerpo dirigido contra la Tyr-397 fosforilada de FAK. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con baicalein produjo una inhibición tanto de la fosforilación de Akt2 en Thr-309 (Figura 21) como de la fosforilación de FAK en Tyr-397 (Figura 22) en células MDA-MB-231 estimuladas con AO.

La formación de contactos focales inducidos por AO requiere de la actividad de 12-LOX

Debido a que la migración es mediada por la formación de contactos focales (*85*), Se analizó el papel de 12-LOX en la formación de estos complejos proteicos. Para ello, células MDA-MB-231 fueron cultivadas sobre cubreobjetos y tratadas con baicalein 20 µM por 24 h. Posteriormente las células fueron estimuladas con AO 100 µM por 15 min. La formación de contactos focales se observó mediante microscopía confocal y la cuantificación de los contactos focales se realizó mediante el análisis de la Inmunofluorescencia de la proteína paxilina, la cual es un marcador de contactos focales (*86*). Nuestros resultados previos (figura 13) mostraron que el AO induce un incremento en la cantidad de contactos focales formados en células MDA-MB-231. Así pues, con baicalein más el estímulo con AO indujo un incremento en la formación y tamaño de los contactos focales en células MDA-MB-231 (Figura 23).





Figura. 18. La migración celular inducida por AO es dependiente de la vía de 12-LOX.

Células MDA-MB-231 fueron tratadas con o sin baicalein 20 µM por 24 h, se realizó la ralladura y fueron tratadas con AO 100 µM por 48 h. A) Imagen representativa de tres experimentos independientes. B) Gráfica del análisis estadístico densitométrico del incremento por efecto del estímulo en relación al basal y de la inhibición en relación al estímulo. Los asteriscos denotan la significancia estadística (***P <0.001) por ANOVA de una vía.





independientes. C) La figura muestra la imagen representativa del Wertern Blot mediante el cual se analizó la expresión de 12-LOX. Los asteriscos denotan la significancia estadística *P < 0.05, **P < 0.01.



Figura. 20. La migración celular inducida por AO en células MCF-7 es dependiente de la vía de 12-LOX. Las células fueron tratadas con o sin baicalein 20 μ M por 24 h, se realizó la ralladura y posteriormente tratadas con AO 100 μ M por 48 h. A) Imagen representativa de tres experimentos independientes. B) Gráfica del análisis estadístico densitométrico del incremento por efecto del estímulo en relación al basal y de la inhibición en relación al estímulo. Los asteriscos denotan la significancia estadística *P <0.05, ** P<0.01 por ANOVA de una vía.

p-Akt2 Thr 309





Figura. 21. La vía de 12 LOX regula la activación de Akt2. Cultivos confluentes de células MDA-MB-321 fueron estimulados con 100 μ M de AO por 20 min, tratados con o sin baicalein 20 μ M. Se obtuvieron extractos totales de proteínas y se analizó la fosforilación de AKT2, mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Akt2 y posteriormente inmunoblot utilizando un anticuerpo monoclonal anti p-Akt2 Thr 309. La membrana fue reprobada con un anticuerpo anti Akt2, para corroborar que se colocó la misma cantidad de proteína en todas las condiciones experimentales. A) Fosforilación de Akt2 en la línea celular MDA-MB.231. B) Gráfica del análisis estadístico y densitométrico de tres experimentos independientes. Los valores están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística ***P* <0.01 por ANOVA de una vía.



Figura. 22. La vía de 12 LOX regula la activación de FAK. Cultivos confluentes de células MDA-MB-321 fueron tratados con (+) o sin (-) baicalein 20 μM, estimulados con 100 μM de AO por 20 min. Se obtuvieron extractos totales de proteínas y se analizó la fosforilación de FAK mediante Inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-FAK y posteriormente inmunoblot utilizando un anticuerpo monoclonal anti p-FAK Tyr 397. La membrana fue reprobada con un anticuerpo anti FAK, para corroborar que se colocó la misma cantidad de proteína en cada una de las condiciones experimentales. A) Fosforilación de FAK en la línea celular MDA-MB-231. B) Gráfica del análisis estadístico y densitométrico de tres experimentos independientes. Los valores están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística **P <0.01 por ANOVA de una vía.



Figura. 23. Papel de 12-LOX en la formación de contactos focales. A) Células MDA-MB-231 fueron ayunadas, tratadas con baicalein por 24 h y estimuladas con 100 µM de AO por 15 min. Posteriormente fueron fijadas, incubadas con anti-paxilina (marcador de

contactos focales) durante toda la noche a 4°C. En seguida, fueron incubadas con un anticuerpo secundario marcado con FITC (color verde) por 2 h y tratadas con faloidina rodaminada (color rojo) por 2 h para teñir actina fibrilar. La figura muestra las microscopias de cada condición experimental, donde se observa que el estímulo incrementa la formación de los contactos focales y con el estímulo más la inhibición de 12-LOX estos se observan de mayor tamaño. B) gráfica del análisis estadístico y de la intensidad de inmunofluorescencia de paxilina, de tres experimentos independientes. Los valores están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística ***P <0.001 por ANOVA de una vía.

El AO induce un incremento en la secreción de 12-HETE en células MDA-MB-231.

Cada vez hay más evidencia de la asociación de 12-HETE y progresión tumoral en varios tipos de cáncer (*87*). Por ello, se evaluó el efecto del AO en la secreción de 12-HETE, utilizando cultivos confluentes de células MDA-MB-231 los cuales fueron tratados con AO 100 µM o con 15 µM de AA (control positivo) por 30 minutos. Se recuperaron los medios condicionados y se cuantifico la concentración de 12-HETE mediante ELISA. Como se muestra en la figura 24, el estímulo con AO induce un incremento en la secreción de 12-HETE, el estímulo con AA se utilizó como control positivo de la secreción de 12-HETE.

El AO induce migración a través de una vía dependiente de GPR31.

Recientemente se identificó un receptor acoplado a proteínas G de alta afinidad para 12-HETE denominado GPR31, a través del cual se sugiere que el 12-HETE activa vías de señalización que favorecen proliferación, sobrevivencia, migración y angiogénesis (*47*) (*51*), se investigó el papel de GPR31 en la migración celular inducida por el AO. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron transfectadas con un siRNA específico para GPR31 o un siRNA scramble (control de especificidad), se hizo la ralladura y las células fueron tratadas por 48 h con AO 100 µM. Los

resultados mostraron que la migración celular inducida por AO es dependiente de la expresión de GPR31 en células MDA-MB-231 (figura 25).



Figura. 24. El AO induce un incremento en la secreción de 12-HETE en células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 fueron ayunadas, estimuladas con AO 100 μ M o AA 15 μ M por 30 min, posteriormente se recuperaron los medios condicionados. La gráfica representa el análisis estadístico de tres experimentos independientes. Los valores están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística **P* <0.05, *** P<0.001 por ANOVA de una vía.



Figura 25. El AO induce migración a través de una vía dependiente de GPR31.

Cultivos de células fueron ayunados durante 12 h con medio sin suero sin antibiótico, transfectadas con un siRNA específico para GPR31 o un siRNA scramble. Se realizó la ralladura y fueron estimuladas con 100 µM de AO por 48 h. A) Muestra la imagen representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) La figura muestra la imagen representativa del Wertern Blot mediante el cual se analizó la expresión de GPR31, en lisados totales. La proteína actina se utilizó como control de carga. C) Grafica del análisis estadístico y densitométrico de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan la significancia estadística *P <0.05, ***P <0.001 por ANOVA de una vía.

Medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO inducen migración en células HUVEC de manera dependiente de GPR31.

Resultados previos mostraron que el AO induce un incremento en la secreción de 12-HETE y reportes recientes indican que el 12-HETE favorece procesos biológicos asociados a la angiogénesis tales como proliferación y migración de células endoteliales (88, 89) se investigó el efecto de medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO sobre células HUVEC. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados con AO 100 µM a diferentes tiempos, se recolectaron los medios condicionados. Posteriormente, a cultivos confluentes de células se les realizo la ralladura y fueron incubados con los medios HUVEC condicionados de las células MDA-MB-231 durante 48 h. En la figura 26, podemos observar que los medios condicionados recolectados a las 18 y 20 h inducen migración en las células HUVEC. De igual manera, se analizó la participación del receptor GPR31 en la migración de las células HUVEC inducida por los medios condicionados. Para ello, cultivos confluentes de células HUVEC fueron transfectadas con un siRNA específico para GPR31 o un siRNA scramble (control de especificidad), se hizo la ralladura y las células fueron tratadas por 48 h con medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO 100 µM por 18 h. Como se muestra en la figura 27, la migración celular inducida por los medios condicionados en células HUVEC es dependiente de la expresión de GPR31.

El AO induce un incremento en la expresión del mRNA de GPR31 en células MDA-MB-231

Para determinar si el AO induce un cambio en la expresión del mRNA de GPR31, se realizó PCR en tiempo real. En células MDA-MB-231 fueron estimuladas con AO 100 μ M por 24 h, se aisló el RNA total. Se sintetizo el cDNA y se realizó la PCR en tiempo real. En la figura 28, se muestra que el AO induce un incremento en la expresión del mRNA de GPR31.



Figura. 26. Medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO durante 18h y 20h inducen migración celular en células Huvec. Cultivos confluentes de células MDA-MB-321 fueron estimulados con 100 μ M de AO por 10 min, 30 min, 1 h, 18 h, 20 h y como control positivo SFB 10% 20 h. Se recolectaron medios condicionados, posteriormente cultivos confluentes de células HUVEC fueron ayunados por 18 h, tratados con mitomicina C por 2 h, se realizó la ralladura y se estimuló con diferentes concentraciones de AO. A) Curva tiempo respuesta de células MDA-MB-231 tratadas con medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO 100 μ M a diferentes tiempos. B) Gráfica del análisis estadístico y densitométrico de los resultados de tres experimentos independientes. Los resultados están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística ***P <0.001 por ANOVA de una vía.



Figura 27. Migración inducida por medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO durante 18h y 20h en células Huvec, es dependiente de GPR31. Cultivos confluentes de células MDA-MB-321 fueron estimulados con 100 μM de AO por 18 h y 20 h y se recolectaron los medios condicionados, los cuales se utilizaron para estimular a cultivos de células HUEVEC, tal como se describe enseguida. Cultivos confluentes de células HUVEC fueron ayunados por 18 h, transfectados con un siRNA específico para GPR31, tratados con mitomicina C por 2 h, se realizó la ralladura y fueron estimulados por 24 h, con los medios condicionados previamente recolectados. A) La figura muestra la imagen representativa de tres experimentos realizados de manera independiente. B) Gráfica del análisis estadístico y densitométrico de los resultados de tres experimentos independientes. Los resultados están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística *P <0.05, **P <0.01 por ANOVA de una vía.



Figura 28. El AO induce un incremento en la expresión del mRNA de GPR31 en células MDA-MB-231. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron estimulados con AO 100 µM por 24 h, el RNA total fue aislado y el cDNA fue sintetizado. El mRNA de GPR31 analizado mediante PCR en tiempo real. La gráfica representa el análisis estadístico de tres experimentos independientes y los valores están expresados en veces del basal. Los asteriscos denotan la significancia estadística *P <0.05 por ANOVA de una vía.

11. Discusión

Estudios en animales y epidemiológicos han mostrado que existe una asociación entre ácidos grasos u obesidad con tumorigénesis y metástasis (90, 91). En relación al cáncer de mama, estudios epidemiológicos muestran que la obesidad y un consumo elevado de grasas incrementan el riesgo de padecer esta enfermedad (92, 93). Resultados previos de nuestro grupo de trabajo, demostraron que el AO induce proliferación, invasión, secreción de MMP-9, activación de ERK1/2, FAK y Src; además de incrementar la actividad del factor de transcripción AP1 en células de cáncer de mama(77, 79, 94). Sin embargo, las vías de señalización que regulan la migración y la invasión celular inducida por AO en células de cáncer de mama aún no están completamente dilucidadas. Por ello, en este trabajo se investigó el efecto del AO en los procesos de migración e invasión en células de cáncer de mama. Los resultados mostraron que el AO induce migración en las células MCF-7 y MDA-MB-231. Los receptores GPR40 y GPR120 recientemente han sido relacionados con tumorigénesis, migración y metástasis (95, 96). Por ello se evaluó la participación de GPR40 y GPR120 en la migración inducida por el AO, los resultados obtenidos demostraron que el AO induce migración en células MDA-MB-231 y MCF-7 de manera dependiente de la actividad de GPR40 y GPR120. Interesantemente existen estudios donde utilizan células de otros tipos de cáncer y observan que la actividad de estos receptores puede tener papeles diferentes en la progresión tumoral. En células de cáncer de páncreas la pérdida de GPR40 promueve migración, mientras que la pérdida de GPR120 inhibe la migración (97). Sin embargo, en melanoma al inhibir la expresión de GPR40 usando un SiRNA reduce la migración mientras que al inhibir la expresión de GPR120 se observa un incremento en la migración (98). Por lo tanto, el papel de estos dos receptores en cáncer varía dependiendo del tipo celular. También, existe una gran diversidad ligandos los cuales pueden activar a estos receptores y desencadenar diferentes vías de señalización generando un comportamiento celular diferente (99).

La vía PI3K/Akt regula una gran variedad de procesos biológicos incluyendo migración, proliferación, sobrevivencia, síntesis de proteínas, metabolismo de glucosa y carcinogénesis (62). En este estudio demostramos que el AO induce la activación de Akt2, migración celular de manera dependiente de la vía PI3K/Akt en células MDA-MB-231 y en células MCF-7. En células MDA-MB-231, la migración es dependiente de la actividad de Akt2 y en esta misma línea también se observó que los contactos focales inducidos por el AO incrementan su tamaño cuando las células son tratadas con el inhibidor LY294002. Con base en este último resultado sugerimos que la señalización de PI3K está involucrada en el desensamble de los contactos focales durante la migración celular, se requieren más estudios para dilucidar el mecanismo molecular. También se demostró que en células MDA-MB-231 el AO induce invasión de manera dependiente de la actividad de PI3K y Akt. Además nuestros resultados también demuestran que el AO mediante la activación de GPR40 y GPR120 favorece la actividad de PI3K y Akt2 en células MDA-MB-231 y MCF-7. En concordancia con nuestros resultados hay estudios que han demostrado que la activación de GPR120 (100) y GPR40 promueve la fosforilación de Akt (101).

La activación del EGFR a través de GPCRS requiere de la activación de MMPs y de la liberación de ligandos tales como el HB-EGF a partir de factores de crecimiento precursores que se encuentran en la membrana. Nuestros resultados demostraron que el EGFR está regulando migración, formación de contactos focales y activación de NF κ B inducidos por AO en células MDA-MB-231. Está descrito que el AO en células de cáncer de mama induce activación de ERK1/2, un incremento de la translocación de NF κ B al núcleo e invasión de manera dependiente de la transactivación del EGFR (*79, 94*).

El factor de transcripción NFκB se ha relacionado con cáncer debido a que regula la expresión de genes involucrados en proliferación, crecimiento, angiogénesis, adhesión y degradación de matriz extracelular. Nosotros demostramos que, en células MDA-MB-231, el AO promueve la activación de NFκB y su activación es dependiente de PI3K, Akt y EGFR; mientras que en MCF-7 la activación de NFκB
inducida por el AO es dependiente de PI3K y Akt. Estudios han demostrado que Akt fosforila a IkB permitiendo que NF κ B sea liberado y se transloque al núcleo de la célula. Por lo tanto sugerimos que el ácido oleico a través de GPR40 o/y GPR120 induce la transactivación de EGFR favoreciendo así la activación de la vía PI3K/Akt lo que da como resultado la activación de NF κ B, favoreciendo la expresión de genes (ejemplo: GPR31, el cual está involucrado en la modulación de la migración celular inducida por AO).

La enzima 12-LOX es expresada en varias células tumorales. El mARN de esta proteína se ha detectado en eritroleucemia, cáncer de colon, carcinoma epidermoide, glioma humano y cáncer de mama (*82*). Estudios señalan que 12-LOX es un regulador clave en el desarrollo de cáncer en humanos. Esta proteína se encuentra frecuentemente sobre expresada en etapas avanzadas del cáncer lo cual sugiere su asociación con progresión tumoral e invasión *in vivo* (*102, 103*).Nosotros demostramos que 12-LOX está regulando la migración celular inducida por el AO en las células MDA-MB-231 y células MCF-7. En células MDA-MB-23, el AO induce la activación de Akt2 de manera dependiente de la actividad de 12-LOX. Además, cuando inhibimos la actividad de 12-LOX, se observó que la fosforilación de FAK fue afectada y hubo un incremento en el tamaño de los contactos focales inducidos por el AO en células MDA-MB-231. Por lo tanto, proponemos que la actividad de 12-LOX participa en la regulación del desensamble de los contactos focales inducidos por el AO. Se requieren más estudios para dilucidar el mecanismo molecular.

Previamente fue demostrado que en células MDA-MB-231 el AO promueve la activación de FAK y migración de una manera dependiente de la actividad de las enzimas LOX y de un receptor GPCR acoplado a proteínas Gi/Go (77). Nuestros resultados también demostraron que el AO promueve un incremento en la secreción de 12-HETE, un incremento en la expresión del mARN de GPR31 y que la migración celular es dependiente de GPR31 en células MDA-MB-231. Además observamos que medios condicionados de células MDA-MB-231 estimuladas con AO inducen migración de células HUVEC y esta migración se ve inhibida, cuando

la expresión del receptor de 12-HETE (GPR31) se reduce por el uso de un SiRNA específico para este receptor. Este resultado nos sugiere que el incremento en la secreción de 12-HETE inducido por el AO en células de cáncer de mama favorece la migración de células HUVEC, como un efecto parácrino de las células tumorales. Por lo tanto proponemos que el AO es capaz de inducir angiogénesis mediante la activación de 12-LOX, 12-HETE y GPR31. En concordancia con nuestros resultados hay un estudio donde muestran que la fosforilación de 12-LOX por Src en células A431 incrementa la actividad de 12-LOX lo cual da como resultado un incremento en la producción de 12-HETE el cual modula la migración de células endoteliales Convergence of eicosanoid and integrin biology: Role of Src in 12-LOX activation(*104*).

Con base en nuestros resultados proponemos que el AO a través de GPR40 o/y GPR120 promueve la liberación de ácido araquidónico de la membrana el cual es metabolizado por la enzima 12-LOX generando el metabolito 12-HETE, este es secretado al espacio extracelular permitiendo que se una y active a su receptor GPR31, favoreciendo migración celular. Por otro lado, la migración celular también es inducida, mediante la activación del EGFR. Además la migración celular inducida por AO también es regulada por la actividad de PI3K, Akt2, FAK y 12-LOX. Las proteínas PI3K y 12-LOX, parecen estar regulando el desensamble de los contactos focales inducidos por el estímulo con AO, mediante un mecanismo aún desconocido. Por otro lado, la translocación de NFkB al núcleo, es modulada por la actividad de PI3K, Akt2 y EGFR. En resumen, así es como la señalización del AO en células de cáncer de mama, favorece migración, invasión, formación de GPR31 (Figura 29).



Figura. 29. Modelo de señalización propuesto para describir el mecanismo molecular mediante el cual el AO induce migración e invasión en células de cáncer de mama.

12. Conclusión

Los resultados de este estudio, aportan nuevos conocimientos sobre las vías de señalización mediadas por AO en células de cáncer de mama, al demostrar que los receptores GPR31, GPR120, EGFR, GPR31 y las proteínas 12-LOX, PI3K y Akt2 tienen un papel determinante en los procesos de migración e invasión inducidos por AO en células de cáncer de mama.

13. Referencias

- 1. Hennighausen, L., and Robinson, G. W. (2001) Signaling pathways in mammary gland development, *Dev Cell* 1, 467-475.
- 2. Hassiotou, F., and Geddes, D. (2012) Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge, *Clin Anat 26*, 29-48.
- 3. Sopel, M. (2010) The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer, *Folia Morphol (Warsz) 69*, 1-14.
- 4. Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M., and Coleman, W. B. (2013) Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine, *Am J Pathol 183*, 1113-1124.
- 5. Cichon, M. A., Degnim, A. C., Visscher, D. W., and Radisky, D. C. (2010) Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 389-397.
- 6. Patanaphan, V., Salazar, O. M., and Risco, R. (1988) Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis, *South Med J 81*, 1109-1112.
- 7. Jin, X., and Mu, P. (2015) Targeting Breast Cancer Metastasis, *Breast Cancer (Auckl) 9*, 23-34.
- 8. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin 68*, 394-424.
- 9. CENAVECE. (2016) Anuarios de Morbilidad 1984-2015 y CONAPO (2016). Proyecciones de la Población 2010-2050
- 10. INEGI. (2016) Estadisticas de Mortalidad. Base de Datos ; y CONAPO (2014). Proyecciones de la Población 2010-2050.
- 11. INEGI. (2018) "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)", COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 61/18.
- 12. Ketcham, A. S., and Sindelar, W. F. (1975) Risk factors in breast cancer, *Prog Clin Cancer 6*, 99-114.
- 13. Haslam, S. Z., Counterman, L. J., and Nummy, K. A. (1993) Effects of epidermal growth factor, estrogen, and progestin on DNA synthesis in mammary cells in vivo are determined by the developmental state of the gland, *J Cell Physiol* 155, 72-78.
- 14. Narod, S. A. (2006) Modifiers of risk of hereditary breast cancer, *Oncogene 25*, 5832-5836.
- 15. Parsa, P., and Parsa, B. (2009) Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review, *Asian Pac J Cancer Prev 10*, 545-550.
- 16. Kobayashi, S., Sugiura, H., Ando, Y., Shiraki, N., Yanagi, T., Yamashita, H., and Toyama, T. (2012) Reproductive history and breast cancer risk, *Breast Cancer 19*, 302-308.
- Marchbanks, P. A., McDonald, J. A., Wilson, H. G., Folger, S. G., Mandel, M. G., Daling, J. R., Bernstein, L., Malone, K. E., Ursin, G., Strom, B. L., Norman, S. A., Wingo, P. A., Burkman, R. T., Berlin, J. A., Simon, M. S., Spirtas, R., and Weiss, L. K. (2002) Oral contraceptives and the risk of breast cancer, N Engl J Med 346, 2025-2032.
- Hall, M. J., Reid, J. E., Burbidge, L. A., Pruss, D., Deffenbaugh, A. M., Frye, C., Wenstrup, R. J., Ward, B. E., Scholl, T. A., and Noll, W. W. (2009) BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer, *Cancer 115*, 2222-2233.

- 19. Nistor, A., Watson, P. H., Pettigrew, N., Tabiti, K., Dawson, A., and Myal, Y. (2006) Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer, *BMC Clin Pathol 6*, 2.
- 20. Khan, N., Afaq, F., and Mukhtar, H. (2010) Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies, *Cancer Lett 293*, 133-143.
- 21. Terry, P. D., and Rohan, T. E. (2002) Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 953-971.
- 22. Romieu, I. (2011) Diet and breast cancer, *Salud Publica Mex 53*, 430-439.
- McTiernan, A., Wu, L., Chen, C., Chlebowski, R., Mossavar-Rahmani, Y., Modugno, F., Perri, M. G., Stanczyk, F. Z., Van Horn, L., and Wang, C. Y. (2006) Relation of BMI and physical activity to sex hormones in postmenopausal women, *Obesity (Silver Spring)* 14, 1662-1677.
- 24. McTiernan, A. (2008) Mechanisms linking physical activity with cancer, *Nat Rev Cancer 8*, 205-211.
- 25. Welsch, C. W. (1992) Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique, *Cancer Res 52*, 2040s-2048s.
- 26. Pariza, M. W. (1987) Dietary fat, calorie restriction, ad libitum feeding, and cancer risk, *Nutr Rev 45*, 1-7.
- 27. Rogers, A. E. (1997) Diet and breast cancer: studies in laboratory animals, *J Nutr* 127, 933S-935S.
- 28. Rossini, A., Zanobbio, L., Sfondrini, L., Cavalleri, A., Secreto, G., Morelli, D., Palazzo, M., Sommariva, M., Tagliabue, E., Rumio, C., and Balsari, A. (2013) Influence of fatty acid-free diet on mammary tumor development and growth rate in HER-2/Neu transgenic mice, *J Cell Physiol 228*, 242-249.
- 29. Agostoni, C., and Bruzzese, M. G. (1992) [Fatty acids: their biochemical and functional classification], *Pediatr Med Chir* 14, 473-479.
- 30. Papackova, Z., and Cahova, M. (2015) Fatty acid signaling: the new function of intracellular lipases, *Int J Mol Sci 16*, 3831-3855.
- Goodstine, S. L., Zheng, T., Holford, T. R., Ward, B. A., Carter, D., Owens, P. H., and Mayne,
 S. T. (2003) Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women, *J Nutr* 133, 1409-1414.
- 32. Voorrips, L. E., Brants, H. A., Kardinaal, A. F., Hiddink, G. J., van den Brandt, P. A., and Goldbohm, R. A. (2002) Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer, *Am J Clin Nutr 76*, 873-882.
- 33. Menendez, J. A., Vellon, L., Colomer, R., and Lupu, R. (2005) Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification, *Ann Oncol 16*, 359-371.
- London, S. J., Sacks, F. M., Stampfer, M. J., Henderson, I. C., Maclure, M., Tomita, A., Wood, W. C., Remine, S., Robert, N. J., Dmochowski, J. R., and et al. (1993) Fatty acid composition of the subcutaneous adipose tissue and risk of proliferative benign breast disease and breast cancer, J Natl Cancer Inst 85, 785-793.
- 35. Wirfalt, E., Mattisson, I., Gullberg, B., Johansson, U., Olsson, H., and Berglund, G. (2002) Postmenopausal breast cancer is associated with high intakes of omega6 fatty acids (Sweden), *Cancer Causes Control 13*, 883-893.
- 36. Mahoney, J. P., and Sunahara, R. K. (2016) Mechanistic insights into GPCR-G protein interactions, *Curr Opin Struct Biol* 41, 247-254.

- 37. Gurevich, V. V., and Gurevich, E. V. (2017) Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective, *Int J Mol Sci 18*.
- 38. Hara, T., Hirasawa, A., Ichimura, A., Kimura, I., and Tsujimoto, G. (2011) Free fatty acid receptors FFAR1 and GPR120 as novel therapeutic targets for metabolic disorders, *J Pharm Sci 100*, 3594-3601.
- 39. Ichimura, A., Hirasawa, A., Hara, T., and Tsujimoto, G. (2009) Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis, *Prostaglandins Other Lipid Mediat 89*, 82-88.
- 40. Yonezawa, T., Katoh, K., and Obara, Y. (2004) Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7, *Biochem Biophys Res Commun 314*, 805-809.
- 41. Hardy, S., St-Onge, G. G., Joly, E., Langelier, Y., and Prentki, M. (2005) Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40, *J Biol Chem* 280, 13285-13291.
- 42. Greene, E. R., Huang, S., Serhan, C. N., and Panigrahy, D. (2011) Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids, *Prostaglandins Other Lipid Mediat 96*, 27-36.
- 43. Exton, J. H. (1994) Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction, *Biochim Biophys Acta* 1212, 26-42.
- 44. Tang, X., Edwards, E. M., Holmes, B. B., Falck, J. R., and Campbell, W. B. (2006) Role of phospholipase C and diacylglyceride lipase pathway in arachidonic acid release and acetylcholine-induced vascular relaxation in rabbit aorta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol 290*, H37-45.
- 45. Edpuganti, V., and Mehvar, R. (2013) UHPLC-MS/MS analysis of arachidonic acid and 10 of its major cytochrome P450 metabolites as free acids in rat livers: effects of hepatic ischemia, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 964*, 153-163.
- 46. Catalano, A., and Procopio, A. (2005) New aspects on the role of lipoxygenases in cancer progression, *Histol Histopathol 20*, 969-975.
- 47. Pidgeon, G. P., Lysaght, J., Krishnamoorthy, S., Reynolds, J. V., O'Byrne, K., Nie, D., and Honn, K. V. (2007) Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival, *Cancer Metastasis Rev 26*, 503-524.
- 48. Wang, D., and Dubois, R. N. (2010) Eicosanoids and cancer, *Nat Rev Cancer 10*, 181-193.
- 49. Panigrahy, D., Kaipainen, A., Greene, E. R., and Huang, S. (2010) Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer, *Cancer Metastasis Rev 29*, 723-735.
- 50. Nie, D., Krishnamoorthy, S., Jin, R., Tang, K., Chen, Y., Qiao, Y., Zacharek, A., Guo, Y., Milanini, J., Pages, G., and Honn, K. V. (2006) Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells, *J Biol Chem 281*, 18601-18609.
- 51. Guo, Y., Zhang, W., Giroux, C., Cai, Y., Ekambaram, P., Dilly, A. K., Hsu, A., Zhou, S., Maddipati, K. R., Liu, J., Joshi, S., Tucker, S. C., Lee, M. J., and Honn, K. V. (2011) Identification of the orphan G protein-coupled receptor GPR31 as a receptor for 12-(S)hydroxyeicosatetraenoic acid, *J Biol Chem 286*, 33832-33840.
- Steele, V. E., Holmes, C. A., Hawk, E. T., Kopelovich, L., Lubet, R. A., Crowell, J. A., Sigman, C. C., and Kelloff, G. J. (1999) Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 8*, 467-483.
- 53. Liu, X. H., Connolly, J. M., and Rose, D. P. (1996) The 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cell line exhibits estrogen-independent, but estrogen and omega-6 fatty acid-stimulated proliferation in vitro, and enhanced growth in athymic nude mice, *Cancer Lett 109*, 223-230.
- 54. Dillon, R. L., and Muller, W. J. (2010) Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression, *Cancer Res 70*, 4260-4264.

- 55. Chalhoub, N., and Baker, S. J. (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer, *Annu Rev Pathol 4*, 127-150.
- 56. Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A 95*, 11211-11216.
- 57. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science 307*, 1098-1101.
- 58. Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., and Zhao, J. J. (2009) Targeting the phosphoinositide 3kinase pathway in cancer, *Nat Rev Drug Discov 8*, 627-644.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings,
 B. A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1, *EMBO J 15*, 6541-6551.
- 60. Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., and Jacinto, E. (2008) The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C, *EMBO J 27*, 1932-1943.
- 61. Arboleda, M. J., Lyons, J. F., Kabbinavar, F. F., Bray, M. R., Snow, B. E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B. Y., and Slamon, D. J. (2003) Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells, *Cancer Res 63*, 196-206.
- 62. Vivanco, I., and Sawyers, C. L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer, *Nat Rev Cancer 2*, 489-501.
- 63. Karin, M. (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression, *Nature* 441, 431-436.
- 64. Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex, *Nature 395*, 297-300.
- 65. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell 100*, 57-70.
- Bargou, R. C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M. Y., Arnold, W., Royer, H. D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., and Dorken, B. (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells, J Clin Invest 100, 2961-2969.
- 67. Naugler, W. E., and Karin, M. (2008) NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms, *Curr Opin Genet Dev 18*, 19-26.
- 68. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit, *Nat Rev Cancer 2*, 301-310.
- 69. Pahl, H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene 18*, 6853-6866.
- 70. Wang, X., Belguise, K., Kersual, N., Kirsch, K. H., Mineva, N. D., Galtier, F., Chalbos, D., and Sonenshein, G. E. (2007) Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2, *Nat Cell Biol 9*, 470-478.
- 71. Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow?, *Lancet 357*, 539-545.
- 72. Basseres, D. S., and Baldwin, A. S. (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression, *Oncogene 25*, 6817-6830.
- 73. Jiang, P., Enomoto, A., and Takahashi, M. (2009) Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton, *Cancer Lett 284*, 122-130.

- 74. Friedl, P., and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms, *Nat Rev Cancer 3*, 362-374.
- 75. Valastyan, S., and Weinberg, R. A. (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms, *Cell 147*, 275-292.
- 76. Hardy, S., Langelier, Y., and Prentki, M. (2000) Oleate activates phosphatidylinositol 3kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects, *Cancer Res 60*, 6353-6358.
- Navarro-Tito, N., Soto-Guzman, A., Castro-Sanchez, L., Martinez-Orozco, R., and Salazar, E.
 P. (2010) Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway, *Int J Biochem Cell Biol 42*, 306-317.
- 78. Sun, P., Wang, T., Zhou, Y., Liu, H., Jiang, H., Zhu, W., and Wang, H. DC260126: a smallmolecule antagonist of GPR40 that protects against pancreatic beta-Cells dysfunction in db/db mice, *PLoS One 8*, e66744.
- 79. Soto-Guzman, A., Robledo, T., Lopez-Perez, M., and Salazar, E. P. (2008) Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells, *Mol Cell Endocrinol 294*, 81-91.
- Sparks, S. M., Chen, G., Collins, J. L., Danger, D., Dock, S. T., Jayawickreme, C., Jenkinson, S., Laudeman, C., Leesnitzer, M. A., Liang, X., Maloney, P., McCoy, D. C., Moncol, D., Rash, V., Rimele, T., Vulimiri, P., Way, J. M., and Ross, S. (2014) Identification of diarylsulfonamides as agonists of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120), *Bioorg Med Chem Lett 24*, 3100-3103.
- 81. DiDonato, J. A., Mercurio, F., and Karin, M. (2012) NF-kappaB and the link between inflammation and cancer, *Immunol Rev 246*, 379-400.
- Honn, K. V., Tang, D. G., Gao, X., Butovich, I. A., Liu, B., Timar, J., and Hagmann, W. (1994) 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis, *Cancer Metastasis Rev* 13, 365-396.
- 83. Mashima, R., and Okuyama, T. (2015) The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives, *Redox Biol 6*, 297-310.
- 84. Weisinger, G., Grafi-Cohen, M., Hirsh, M., Knoll, E., Sharon, O., Many, A., Limor, R., and Stern, N. (2013) 12S-Lipoxygenase is necessary for human vascular smooth muscle cell survival, *Exp Cell Res 319*, 1586-1593.
- 85. Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P. J. (2004) Focal adhesion regulation of cell behavior, *Biochimica et biophysica acta 1692*, 103-119.
- 86. Schaller, M. D. (2001) Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein, *Oncogene 20*, 6459-6472.
- 87. Nie, D., and Honn, K. V. (2002) Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis, *Cell Mol Life Sci 59*, 799-807.
- 88. Tang, D. G., Renaud, C., Stojakovic, S., Diglio, C. A., Porter, A., and Honn, K. V. (1995) 12(S)-HETE is a mitogenic factor for microvascular endothelial cells: its potential role in angiogenesis, *Biochem Biophys Res Commun 211*, 462-468.
- 89. Nie, D., Tang, K., Diglio, C., and Honn, K. V. (2000) Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase, *Blood 95*, 2304-2311.
- 90. Khandekar, M. J., Cohen, P., and Spiegelman, B. M. (2011) Molecular mechanisms of cancer development in obesity, *Nat Rev Cancer 11*, 886-895.
- 91. Nieman, K. M., Romero, I. L., Van Houten, B., and Lengyel, E. (2013) Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis, *Biochim Biophys Acta 1831*, 1533-1541.

- 92. Boyd, N. F., Stone, J., Vogt, K. N., Connelly, B. S., Martin, L. J., and Minkin, S. (2003) Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature, *Br J Cancer 89*, 1672-1685.
- 93. Lahmann, P. H., Hoffmann, K., Allen, N., van Gils, C. H., Khaw, K. T., Tehard, B., Berrino, F., Tjonneland, A., Bigaard, J., Olsen, A., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Nagel, G., Boeing, H., Trichopoulos, D., Economou, G., Bellos, G., Palli, D., Tumino, R., Panico, S., Sacerdote, C., Krogh, V., Peeters, P. H., Bueno-de-Mesquita, H. B., Lund, E., Ardanaz, E., Amiano, P., Pera, G., Quiros, J. R., Martinez, C., Tormo, M. J., Wirfalt, E., Berglund, G., Hallmans, G., Key, T. J., Reeves, G., Bingham, S., Norat, T., Biessy, C., Kaaks, R., and Riboli, E. (2004) Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC), *Int J Cancer 111*, 762-771.
- 94. Soto-Guzman, A., Navarro-Tito, N., Castro-Sanchez, L., Martinez-Orozco, R., and Salazar, E.
 P. (2010) Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells, *Clin Exp Metastasis 27*, 505-515.
- 95. Wu, Q., Wang, H., Zhao, X., Shi, Y., Jin, M., Wan, B., Xu, H., Cheng, Y., Ge, H., and Zhang, Y. (2013) Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumor-promoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma, *Oncogene 32*, 5541-5550.
- 96. Munkarah, A., Mert, I., Chhina, J., Hamid, S., Poisson, L., Hensley-Alford, S., Giri, S., and Rattan, R. (2016) Targeting of free fatty acid receptor 1 in EOC: A novel strategy to restrict the adipocyte-EOC dependence, *Gynecol Oncol 141*, 72-79.
- 97. Fukushima, K., Yamasaki, E., Ishii, S., Tomimatsu, A., Takahashi, K., Hirane, M., Fukushima, N., Honoki, K., and Tsujiuchi, T. (2015) Different roles of GPR120 and GPR40 in the acquisition of malignant properties in pancreatic cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun 465*, 512-515.
- 98. Fukushima, K., Takahashi, K., Fukushima, N., Honoki, K., and Tsujiuchi, T. (2016) Different effects of GPR120 and GPR40 on cellular functions stimulated by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in melanoma cells, *Biochem Biophys Res Commun 475*, 25-30.
- 99. Mobraten, K., Haug, T. M., Kleiveland, C. R., and Lea, T. (2013) Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells, *Lipids Health Dis* 12, 101.
- 100. Wellhauser, L., and Belsham, D. D. (2014) Activation of the omega-3 fatty acid receptor GPR120 mediates anti-inflammatory actions in immortalized hypothalamic neurons, *J Neuroinflammation* 11, 60.
- 101. Mena, S. J., Manosalva, C., Carretta, M. D., Teuber, S., Olmo, I., Burgos, R. A., and Hidalgo, M. A. (2016) Differential free fatty acid receptor-1 (FFAR1/GPR40) signalling is associated with gene expression or gelatinase granule release in bovine neutrophils, *Innate Immun 22*, 479-489.
- 102. Nie, D., Hillman, G. G., Geddes, T., Tang, K., Pierson, C., Grignon, D. J., and Honn, K. V. (1998) Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth, *Cancer Res 58*, 4047-4051.
- 103. Guo, A. M., Liu, X., Al-Wahab, Z., Maddippati, K. R., Ali-Fehmi, R., Scicli, A. G., and Munkarah, A. R. (2011) Role of 12-lipoxygenase in regulation of ovarian cancer cell proliferation and survival, *Cancer Chemother Pharmacol 68*, 1273-1283.
- 104. Dilly, A. K., Tang, K., Guo, Y., Joshi, S., Ekambaram, P., Maddipati, K. R., Cai, Y., Tucker, S. C., and Honn, K. V. (2016) Convergence of eicosanoid and integrin biology: Role of Src in 12-LOX activation, *Exp Cell Res 351*, 1-10.