

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**“Estudio de la fosfolipasa D en los mecanismos de migración e  
invasión inducidos por ácido linoleico en células de cáncer de  
mama MDA-MB-231”**

**TESIS**

Que presenta

**M. en C. Ricardo Díaz Aragón**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR**

Director de la Tesis

**Dr. José Eduardo Pérez Salazar**

Asesores

**Dr. Antony Boucard Jr.  
Dr. Francisco García Sierra  
Dra. Patricia Talamás Rohana  
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

**Biología Celular-CINVESTAV  
Biología Celular-CINVESTAV  
Infec. y Patog. Molecular-CINVESTAV  
Ciencias de la Salud-UAM-I**

## **APOYOS**

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. José Eduardo Pérez Salazar del Departamento de Biología Celular. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT), a través de una beca de doctorado de agosto de 2014 a Julio de 2018, con número de registro 482926.

Este trabajo fue financiado con el apoyo económico de los donativos del CONACyT, otorgados para el proyecto CB-0182450.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. José Eduardo Pérez Salazar** por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, la confianza depositada en mi proyecto y por su apoyo incondicional durante el desarrollo de mis estudios de posgrado, especialmente en los momentos más difíciles, tanto en la parte académica como en la parte personal. Con mucho respeto y afecto, gracias.

A mis sinodales: **Dr. Antony Boucard Jr., Dr. Francisco García Sierra, Dra. Patricia Talamás Rohana, Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz** por su asesoría, disponibilidad y amabilidad en la revisión de la tesis. De manera especial al **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz** por su ayuda y las facilidades ofrecidas en su laboratorio durante la realización de experimentos.

Al **Dr. Pedro Cortés Reynosa**, auxiliar del laboratorio 42 del Departamento de Biología Celular, por su amistad, constante asesoría y apoyo técnico incondicional durante mi estancia en el laboratorio. Es de gran valor para mí, su gran disponibilidad mostrada en todo momento para explicar los fundamentos de los ensayos experimentales, así como en la revisión detallada de la tesis. Muchas gracias.

A **Nora Araceli Ruíz Durán**, técnico del laboratorio 42 del Departamento de Biología Celular, por su entrañable amistad desde el primer día, hasta el último. Muchas gracias por tu cariño y apoyo.

A **mis amigos y compañeros del laboratorio 42**: A todos y cada uno de ellos, empezando desde el líder del laboratorio, el auxiliar y la técnico, hasta cada uno de los compañeros con los que me tocó convivir en determinado tiempo, porque de cada uno se recoge apoyo, consejos y experiencia durante la estancia en el posgrado y que nos permite adaptarla en el ámbito profesional y personal. Gracias por los momentos que compartimos juntos.

A las secretarías del Departamento de Biología Celular **Blanca Estela Olguín** y **Clara Hernández Chavez** por su asistencia secretarial durante mi estancia de posgrado.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Anatomía de la glándula mamaria y cáncer de mama.....	4
Factores de riesgo .....	6
Ácidos grasos y cáncer de mama.....	6
Papel del AL en cáncer de mama.....	8
Receptores acoplados a proteínas G y familia de FFARs .....	8
Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) .....	9
Migración celular en cáncer .....	11
Invasión celular en cáncer .....	13
Fosfolipasa D .....	14
Factor nuclear $\kappa$ B .....	16
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general .....	18
Objetivos particulares .....	18
MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
Material y reactivos .....	19
Cultivo celular.....	19
Estimulación celular .....	19
Ensayo de viabilidad celular .....	20
Ensayo de actividad de PLD.....	20
Ensayos de inmunoprecipitación e inmunodetección (WB).....	20
Ensayo de cierre de herida por rayadura .....	21
Ensayos de migración quimiotáctica e invasión celular (método de cámara de Boyden) .....	21
Preparación de extractos nucleares .....	22
Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) .....	22
Ensayo de formación de esferoides celulares en cajas de cultivo de baja adherencia .....	23
Ensayo de formación de esferoides celulares en matrigel y colágeno tipo I.....	23
Análisis estadístico.....	23

RESULTADOS.....	24
AL induce un incremento en la actividad de PLD en células de cáncer de mama MDA-MB-231 .....	24
Participación de PLD en los procesos de migración e invasión celular inducidos por AL	25
Papel de PLD1 y PLD2 en migración e invasión celular inducida por AL .....	28
Papel de FFAR1 y FFAR4 en la activación de PLD, migración e invasión celular inducida por AL .....	30
Migración e invasión inducida por AL en células de cáncer de mama requiere la actividad de EGFR .....	32
Participación de FFAR4 y PLD en la activación de Akt2 dependiente de AL .....	34
AL promueve activación de NFκB a través de una vía que implica ambos FFAR1 y FFAR4, EGFR y PLD.....	36
El AL induce formación de esferoides celulares a través de una vía dependiente de PLD .....	38
Efecto del AL en células de cáncer de mama MCF-7 .....	41
DISCUSIÓN .....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXO ARTÍCULO .....	66

## **ABREVIATURAS**

**AF:** Ácido fosfatídico

**AGs:** Ácidos grasos

**AGLs:** Ácidos grasos libres

**AL:** Ácido linoleico

**BtOH:** 1-butanol

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico

**FFARs:** Receptores a ácidos grasos libres

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos

**GDP:** Guanosín difosfato

**GEF:** Factor de intercambio de nucleótidos de guanina

**GPCRs:** Receptores acoplados a proteínas G

**GRKs:** Cinasas de GPCRs

**GTP:** Guanosín trifosfato

**GTPasas:** Proteínas pequeñas de unión a GTP

**IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1

**IGF-1R:** Receptor al factor de crecimiento insulínico tipo 1

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina-1 $\beta$

**I $\kappa$ k:** Cinasas de I $\kappa$ B

**LPA:** Ácido lisofosfatídico

**MAPKs:** Proteínas activadas por mitógenos

**MB:** Membrana basal

**MEC:** Matriz extracelular

**MMPs:** Metaloproteinasas de matriz

**MUFAs:** Ácidos grasos monoinsaturados

**NFκB:** Factor nuclear κB

**PDB:** Forbol 12,13-dibutirato

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PKC:** Proteína cinasa C

**PLC:** Fosfolipasa C

**PLD:** Fosfolipasa D

**PPARs:** Receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas

**PTP1B:** Proteína tirosina fosfatasa 1B

**PUFAs:** Ácidos grasos poliinsaturados

**RE:** Receptor de estrógenos

**RTKs:** Receptores tirosina cinasa

**SFB:** Suero fetal bovino

**SH2:** Dominio de homología al dominio 2 de Src

**STATs:** Proteínas transductoras de señal y activadores de la transcripción

**S1P:** Esfingosina 1-P

**TEM:** Transición epitelio mesénquima

**Tert-BtOH:** *Tert*-butanol

**TNBC:** Cáncer de mama triple negativo

**VEGF:** Factor de crecimiento de endotelio vascular

## RESUMEN

Estudios epidemiológicos y en modelos animales han establecido una fuerte relación entre una ingesta con altos niveles de ácidos grasos en la dieta y un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama. Particularmente, ácidos grasos libres (AGLs) en circulación sanguínea están involucrados en diversos procesos biológicos, incluyendo proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama. El ácido linoleico (AL) es un ácido graso poliinsaturado  $\omega$ -6 que induce proliferación, migración e invasión de células de cáncer de mama. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales modula procesos tumorales no han sido bien estudiados.

En el presente trabajo, se estudió el papel de fosfolipasa D (PLD) en los mecanismos desencadenados por AL en células de cáncer de mama. PLD presenta dos isoformas, PLD1 y PLD2, y son asociadas a procesos de migración e invasión durante la progresión tumoral. De manera general, PLD es una enzima que hidroliza fosfolípidos de membrana, específicamente fosfatidilcolina, generando ácido fosfatídico (AF) que actúa como segundo mensajero y es implicado en diferentes vías de señalización celular como proliferación, migración e invasión celular. Los resultados del presente estudio mostraron que AL indujo activación de PLD, mientras que actividad de FFAR1/FFAR4, EGFR y ambas isoformas de PLD fueron requeridas en los mecanismos de migración e invasión de células MDA-MB-231. Además, la inhibición de PLD reprimió la activación de Akt2 y NF $\kappa$ B dependiente de AL. Por otro lado, en cultivos tridimensionales (3D), el estímulo con AL promovió la formación de esferoides en la línea celular MDA-MB-231 por un mecanismo que implicó la actividad de PLD. Por último, AL indujo migración, activación de NF $\kappa$ B y formación de esferoides en células de cáncer de mama MCF-7. En conclusión, AL promueve mecanismos de migración e invasión celular a través de vías de señalización que requieren actividad de PLD en células de cáncer de mama MDA-MB-231.



## **ABSTRACT**

Epidemiological studies and animal models have established a strong relationship between an intake with high levels of fatty acids in diet with an increased risk of developing breast cancer. Particularly, free fatty acids (FFAs) in blood circulation are involved in various biological processes, such as proliferation, migration and invasion in breast cancer cells. Linoleic acid (LA) is a  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acid that induces proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. However, molecular mechanisms by which they modulate tumor processes have not been well studied.

In the present study, the role of phospholipase D (PLD) in mechanisms triggered by LA in breast cancer cells was analyzed. PLD presents two isoforms, PLD1 and PLD2, and are associated with processes of migration and invasion during tumor progression. In general, PLD is an enzyme that hydrolyzes membrane phospholipids, specifically phosphatidylcholine, generating phosphatidic acid (PA) that acts as a second messenger and is involved in different cell signaling pathways such as proliferation, migration and cell invasion. The present results showed that LA induced PLD activation, whereas activity of FFAR1/FFAR4, EGFR and both PLD isoforms were required in mechanisms of migration and invasion in MDA-MB-231 cells. In addition, inhibition of PLD inhibited activation of Akt2 and NF $\kappa$ B dependent on LA. On the other hand, stimulation with LA promoted the formation of MDA-MB-231 cellular spheroid in three-dimensional (3D) cultures by a mechanism that involved the activity of PLD. Finally, LA was able to induce migration, NF $\kappa$ B activation and spheroid formation in MCF-7 breast cancer cells. In conclusion, LA promotes mechanisms of migration and invasion through signaling pathways that require PLD activity in MDA-MB-231 breast cancer cells.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente dentro de todos los tipos de cáncer diagnosticados en mujeres de 20 años y mayores, presentando una incidencia aproximada de 1.67 millones (25% del total de cánceres en mujeres) de nuevos casos en el año 2012. La incidencia varía de una región geográfica a otra, encontrándose las tasas más altas en América del Norte, Australia y Europa Occidental, tasas de incidencia media en Europa del este y tasas bajas en América Latina, África y Asia (con excepción de Israel). El cáncer de mama es la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres de todo el mundo, registrándose 571,000 muertes en el año 2015. Cabe señalar que mientras las tasas más altas de incidencia se encuentran en países desarrollados, las tasas de mortalidad son mayores en países en desarrollo [1,2].

El cáncer de mama exhibe un problema grave de salud pública en América Latina. En México, la incidencia de esta neoplasia presenta un comportamiento ascendente en los últimos años. Para el año 2014 presentó un incremento del 14.63% comparado con el año 2007, registrándose 28.75 nuevos casos por cada 100 mil mujeres mayores de 20 años. Además, esta neoplasia es la primera causa de muerte en mujeres por tumores malignos desde el año 2006, superando al cáncer cervicouterino. Los decesos por esta neoplasia pasaron de 5.6 muertes en el año 1979 a 10.1 muertes por cada 100,000 mujeres en el año 2006. Una proyección de mortalidad por cáncer de mama para el año 2020 muestra que superará los 11 casos por cada 100,000 mujeres. Sin embargo, esta enfermedad presenta una distribución heterogénea, encontrándose las tasas más altas de mortalidad en Baja California Norte y Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Colima y Jalisco; los estados con tasas intermedias son Hidalgo, Puebla, Sonora, Zacatecas y la Ciudad de México; mientras que los estados del sureste registran las tasas de mortalidad más bajas. En particular, las entidades donde se registra un mayor incremento en las tasas de incidencia de cáncer mamario en las últimas dos décadas son los estados del norte y la Ciudad de México, teniendo una distribución heterogénea relacionada con el entorno sociocultural y económico de las regiones, teniendo los estados del norte y la Ciudad de México tienen ingresos económicos más elevados, dando como

consecuencia cambios a estilos de vida y reproductivos semejantes al de poblaciones de países desarrollados. Dentro de estos cambios se incluyen los tipos de dietas que favorecen el sobrepeso y obesidad, así como otros factores asociados con el desarrollo del cáncer mamario, tales como nuliparidad y limitados hábitos de lactancia, entre otros [3–5].

En México y Latinoamérica, el mayor número de nuevos casos oscila entre mujeres de 50-64 años. Por el contrario, países desarrollados como USA y Europa, el mayor número de nuevos casos se presentan en mujeres de 65 años y mayores. La edad promedio de diagnóstico de cáncer de mama en México es de 53.6 años; mientras que en países desarrollados como USA y España la edad promedio es de 70 y 60 años respectivamente. A nivel nacional, el porcentaje de carcinomas *in situ* detectados es del 2%, en contraposición a USA que es de 20%, dando como resultado que en México los carcinomas mamarios son detectados en etapas tardías. Esta detección tardía puede ser el reflejo del incremento de mortalidad en países en desarrollo con respecto a países desarrollados [6–8].

### **Anatomía de la glándula mamaria y cáncer de mama**

La glándula mamaria es un órgano exclusivo de la clase mamífero y tiene un origen ectodérmico en el desarrollo embrionario. Está formada por una serie de ductos y lóbulos, rodeados por una membrana basal (MB) que separa el epitelio del estroma. Este órgano está organizado en estructuras tubulares compuestas de una bicapa celular polarizada. Es decir, una capa interna de células de epitelio luminal que encapsulan el lumen de ductos y alveolos, su morfología es cuboidal y algunas células localizadas en el extremo terminal del ducto poseen potencial de diferenciarse a lactocitos durante la lactación. Con respecto a la capa basal o externa, está formada por células mioepiteliales contráctiles que se encuentran en contacto con la MB y tiene propiedades de células de músculo liso. La función principal de la glándula mamaria es la de sintetizar, secretar y entregar leche al recién nacido para la óptima nutrición, protección y desarrollo durante sus primeros meses de vida. La glándula mamaria está sujeta a cambios dramáticos en relación con la composición, arquitectura y función, asociados al crecimiento infantil, expansión pubertal,

embarazo, lactancia e involución post-menopáusica. Estos cambios están mediados por procesos endócrinos y reproductivos, incrementando el riesgo de desarrollar cáncer de mama [9–11].

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, clasificada de acuerdo a diferentes comportamientos clínicos y diversos subtipos, caracterizados mediante un perfil molecular distinto. El inicio de esta enfermedad está relacionado a eventos genéticos y epigenéticos transformantes en una única célula, una subsecuente progresión producto de acumulación de cambios genéticos adicionales combinados con expansión clonal y selección, resultando en una proliferación descontrolada de células epiteliales transformadas. La progresión tumoral ocurre a través de una serie de etapas bien definidas, iniciando con una proliferación epitelial anormal, progresando a carcinoma *in situ* y posteriormente a carcinoma invasivo y metastásico. Como se ejemplifica en la figura 1, la metástasis es un proceso complejo, el cual ocurre a través de una serie de etapas secuenciales, incluyendo: 1) Migración e invasión de células tumorales al tejido adyacente, 2) Intravasación, 3) Transporte y sobrevivencia en el sistema circulatorio (linfático o sanguíneo), 4) Extravasación y arresto en un sitio secundario, 5) Inicio y mantenimiento del crecimiento, con neovascularización del tumor secundario [12,13].

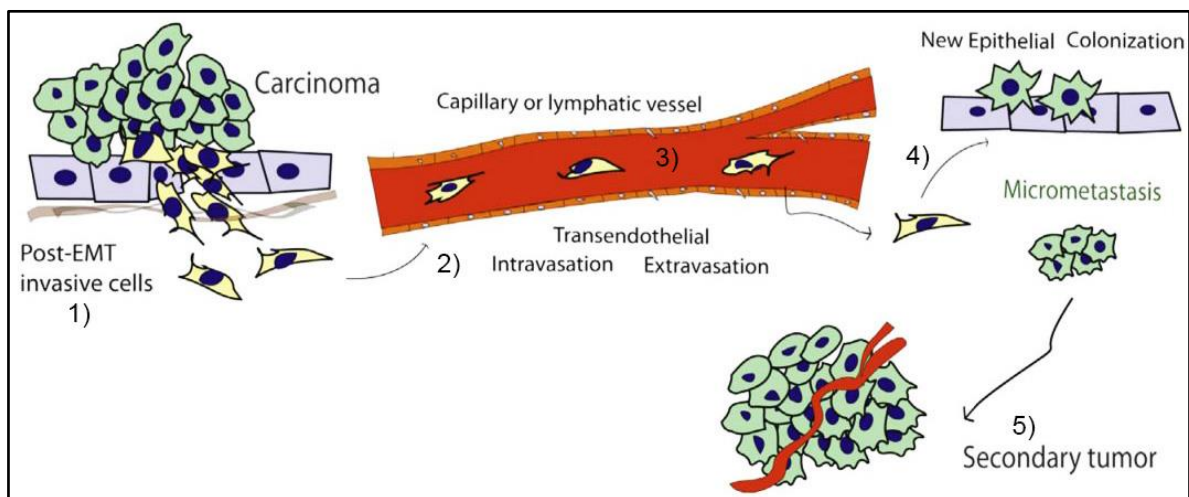


Figura 1. Modelo de metástasis en cáncer de mama [14].

## **Factores de riesgo**

Además del género, existen diversos factores que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama, tales como genéticos, hormonales, reproductivos y de estilo de vida. Los factores genéticos comprenden principalmente mutaciones hereditarias en genes BRCA1 y BRCA2 que confieren susceptibilidad al cáncer de mama (aportando un 25% de riesgo para esta enfermedad), historia familiar de cáncer de mama y alta densidad de tejido mamario. Los factores hormonales y reproductivos están dados por una menarca temprana (antes de los 11 años) y una menopausia tardía (después de los 55 años), nuliparidad, tener el primer hijo después de los 30 años, no amamantar y el uso de terapia hormonal en la menopausia (especialmente la terapia combinada de estrógeno y progestina). Por otro lado, los factores asociados al estilo de vida están dados por sobrepeso y obesidad después de la menopausia, inactividad física y la ingesta de alcohol [12,13,15]. Recientemente, se ha asociado al cáncer de mama con la adopción de un estilo de vida “occidentalizado”, propio de países desarrollados, que se caracteriza por una dieta con un alto contenido de carbohidratos y grasas. Este estilo de vida, aunado con una baja actividad física, conlleva a obesidad y sobrepeso [16], condiciones caracterizadas por una hiperlipidemia e incremento de la concentración de ácidos grasos (AGs) libres (AGLs) circulantes en sangre. Además, previos estudios epidemiológicos muestran que personas que migran a otro país y adquieren un estilo de vida parecido al occidental, incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama en generaciones descendientes [17]. Por todo lo anterior, la dieta ha sido destacada entre los factores ambientales de riesgo potenciales, puesto que la obesidad y factores dietéticos aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama [18–23].

## **Ácidos grasos y cáncer de mama**

Los AGs se dividen en saturados e insaturados. Los AGs insaturados se dividen en monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs), la mayoría de estos últimos, al no poder ser sintetizados por el organismo, se consideran esenciales, por lo que deben consumirse en la dieta. Los PUFAs se clasifican en dos familias: omega-3 ( $\omega$ -3) y omega-6 ( $\omega$ -6), con base en la primera posición del doble enlace con respecto al grupo metilo terminal. Los PUFAs  $\omega$ -3 presentan el primer doble

enlace en el tercer átomo de carbono, mientras que los PUFAs  $\omega$ -6 en el carbono 6. Los PUFAs  $\omega$ -3 comprenden al ácido eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA),  $\alpha$ -linolénico (ALA) y esteridónico (AS), encontrándose en altas proporciones en aceites de pescado y algunas semillas vegetales como linaza y chía. Los PUFAs  $\omega$ -6 comprenden el ácido linoleico (AL), araquidónico (AA), docosapentaenoico (DPA) y  $\gamma$ -linolénico (GLA), encontrándose en aceites de origen vegetal. En particular, el AL se destaca por su alto contenido en aceites vegetales, contribuyendo al 80% de AGs presentes en aceites de origen vegetal. La dieta típica de la población contemporánea, en especial del hemisferio occidental, tiene una relación 10:1 de  $\omega$ -6 con respecto a  $\omega$ -3, estimándose una ingesta diaria de AL ( $\omega$ -6) de aproximadamente 14 g y de 2 g de ingesta diaria de ALA ( $\omega$ -3) [24–26]. Recientemente, estudios epidemiológicos y en modelos animales han sugerido que los AGs exógenos pueden participar en la etiología, evolución y progresión del cáncer de mama; mientras que estudios epidemiológicos han demostrado que tanto la cantidad de grasa y el tipo de AGs presentes en la dieta afectan el crecimiento tumoral y metástasis [27].

Los AGLs son nutrientes que ejercen diversos efectos biológicos y han sido implicados en múltiples enfermedades, desempeñando papeles protectores o nocivos, dependiendo del contexto. Estos AGLs son importantes para el organismo como fuente de energía metabólica, a nivel celular como sustratos para la biogénesis de fosfolípidos de membrana y el almacenamiento de energía metabólica en forma de triglicéridos y ésteres de colesterol. Por otro lado, los AGLs pueden actuar como moléculas de señalización regulando directa o indirectamente procesos celulares como proliferación y desarrollo celular, así como expresión génica [28]. Los AGLs son capaces de activar a receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), los cuales son mediadores de la transcripción de genes implicados en el metabolismo de lípidos y glucosa [29]. Sin embargo, los AGLs también son capaces de mediar diversos procesos biológicos independientes de los PPARs, tales como proliferación, migración e invasión celular, dichos procesos son regulados a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), específicamente la familia de receptores a ácidos grasos libres (FFARs) [26–30].

## **Papel del AL en cáncer de mama**

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama y está asociada con incremento en concentraciones plasmáticas de AGLs. Particularmente, el AL en la dieta contribuye a una alta incidencia de cáncer de mama en mujeres occidentales, estimándose una ingesta en la dieta diaria de 15-20 g, alcanzando una concentración en plasma de 275  $\mu\text{M}$  [31,32]. Previos reportes indican que el estímulo con AL promueve migración e invasión en células de cáncer de mama MDA-MB-231, así como también un incremento en la expresión de PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno-1), IGF-1R (receptor al factor de crecimiento insulínico tipo 1) y marcadores tumorales, cuya expresión se incrementa y contribuyen a la patogénesis del cáncer de mama [33–36]. Por otra parte, en células de epitelio mamario no tumorigénico MCF-10A, el AL promueve un proceso similar a la transición epitelio mesénquima (TEM) [37].

## **Receptores acoplados a proteínas G y familia de FFARs**

Los GPCRs son proteínas membranales que poseen siete dominios transmembranales, capaces de unir ligandos extracelulares y consecuentemente activar proteínas G heterotriméricas. Estos receptores regulan diversos procesos celulares como resultado de la activación de vías de transducción de señales. Diversos ligandos pueden unirse como agonistas a los GPCRs, incluyendo aminas biogénicas, aminoácidos, lípidos, péptidos, proteínas y sustancias odoríferas, entre otros, conduciendo a un cambio conformacional en la estructura del receptor y la consecuente interacción con proteínas G heterotriméricas. Una vez activados, los GPCRs pueden actuar como factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), induciendo el intercambio de GDP (guanosín difosfato) por GTP (guanosín trifosfato) en las subunidades  $G\alpha$  y su disociación de las subunidades  $\beta\gamma$ . Las subunidades  $G\alpha$  están agrupadas en cuatro familias ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12/13}$ ) y los complejos  $\beta\gamma$ , los cuales regulan la actividad de proteínas efectoras, tales como la adenilato ciclasa, fosfolipasa C (PLC), RhoGEF, PI3K o canales iónicos dependientes de voltaje. La activación de estas proteínas efectoras genera segundos mensajeros como AMP cíclico, inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), diacilglicerol (DGA) o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ( $\text{PIP}_3$ ), capaces de activar otras proteínas río abajo de

la cascada de señalización, tales como la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa B (Akt). La activación de los GPCRs conduce a su posterior desensibilización, mediada por cinasas de GPCRs (GRKs) que fosforilan al receptor, promoviendo el acoplamiento de la proteína adaptadora arrestina, dando como resultado la internalización del receptor [38–41].

Los FFARs son miembros de la superfamilia de GPCRs y son los receptores a AGLs. Se han descrito cinco receptores que conforman esta subfamilia, denominados: FFAR1 (GPR40), FFAR2 (GPR43), FFAR3 (GPR41), FFAR4 (GPR120), y GPR84, siendo caracterizados por sus respectivos ligandos, patrones de expresión y funciones biológicas. FFAR2 y FFAR3 son activados por AGLs de cadena corta (1-6 carbonos), GPR84 activado por AGLs de cadena media (8-12 carbonos), mientras que FFAR1 y FFAR4 son activados por AGLs de cadena media y larga (14 carbonos y mayores) [42–46]. FFAR1 es expresado abundantemente en páncreas y su activación por AGLs de cadena larga incrementa la secreción de insulina estimulada por glucosa [47]. FFAR4 se expresa abundantemente en el intestino, su activación por AGLs de cadena larga promueve la secreción del péptido-1 similar al glucagón [44]. Asimismo, FFAR1 y FFAR4 son expresados en células de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y en células epiteliales mamarias no tumorigénicas MCF-10A promoviendo procesos de proliferación, migración e invasión celular [48,49].

### **Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

Otro tipo de receptores membranales involucrados en el desarrollo del cáncer son los receptores con actividad catalítica intrínseca de tirosina cinasa (RTKs). Los RTKs presentan un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembranal único en forma de hélice alfa, un dominio citosólico con actividad de tirosina cinasa intrínseca y diversos residuos de tirosina. Con excepción del receptor de insulina permanentemente dimerizado, la unión del ligando provoca un cambio conformacional que permite la dimerización de los receptores, activación de sus dominios cinasa y la autofosforilación de sus residuos en tirosina. Los residuos de tirosina fosforilados sirven como sitios de unión para diversas enzimas, tales como



PLC $\gamma$ 1 o proteínas adaptadoras Grb2/Shc, las cuales presentan dominios de homología al dominio 2 de Src (SH2), iniciando la activación de diversas vías de señalización río abajo desencadenadas por RTKs. Estas vías de señalización incluyen las proteínas activadas por mitógenos (MAPKs), la vía PI3K/Akt, la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) y la vía de PLC $\gamma$ 1 [50,51]. La activación de los RTKs resulta en la modulación de varias proteínas blanco incluyendo la activación de factores de transcripción [52].

El RTK mejor caracterizado es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cuya familia comprende cuatro miembros, ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). ErbB2 es un receptor huérfano y ErbB3 carece de actividad enzimática. La formación de heterodímeros entre los miembros de esta familia es un mecanismo importante para la activación de todos los receptores tras la unión del ligando. Estos receptores participan en el control de proliferación, sobrevivencia y diferenciación celular, siendo su desregulación asociada al desarrollo de cáncer y metástasis. Por otro lado, se ha descrito que diversos ligandos de GPCRs, tales como ácido lisofosfatídico (LPA), trombina, bradiquinina o agonistas adrenérgicos son capaces de desencadenar señales mitogénicas como resultado de la activación de proteínas participantes en las vías de transducción de señales inducidas por miembros de la familia del EGFR. Recientemente, se ha demostrado que los GPCRs son capaces de utilizar al EGFR como intermediario en su señalización, proceso denominado transactivación de receptores membranales. Un mecanismo propuesto para la transactivación del EGFR implica la activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs) de la familia ADAM. Esta transactivación involucra la actividad de la proteína tirosina cinasa Src y la subsiguiente activación de MMPs que realizan corte proteolítico del ectodominio de precursores de ligandos de la familia del EGF presentes en la membrana, los cuales son liberados y activan al EGFR en una forma autócrina/parácrina [38,48]. Asimismo, los GPCRs también pueden inducir la transactivación del EGFR independiente del ligando y MMPs, a través de los diferentes miembros de la familia de la cinasa Src que pueden fosforilar directamente a la tirosina 845 (Tyr-845) y tirosina 1101 (Tyr-1101) en la región citoplasmática del EGFR [53]. Otro mecanismo

de activación de este RTK es la dimerización, donde la interacción directa de un GPCR y un EGFR puede regular la señalización del EGFR [54]. De esta manera, los GPCRs son capaces de actuar como potentes reguladores de procesos celulares tales como proliferación, migración, sobrevivencia e invasión en células cancerosas (Figura 2). Sin embargo, los mecanismos de transactivación de diferentes GPCRs hacia el EGFR, así como la señalización río abajo depende específicamente del contexto celular [38,49].

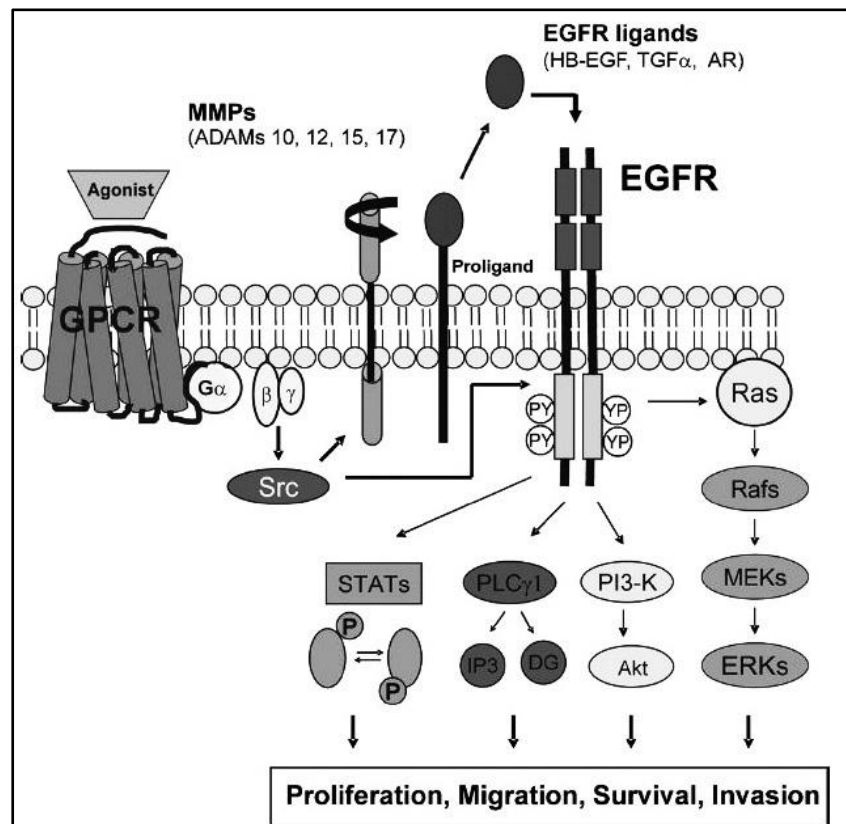


Figura 2. Mecanismos de transactivación del EGFR [38].

## Migración celular en cáncer

La migración celular es un evento clave en las funciones biológicas, incluyendo la respuesta inmunológica, desarrollo embrionario, regeneración de tejidos a través de células madre y cierre de heridas. Aun cuando existe una amplia diversidad de tipos celulares, se han podido identificar mecanismos generales conservados que coordinan el movimiento celular, así como los componentes que se expresan de manera específica en algunos tipos celulares y en condiciones patológicas, en el

caso de la metástasis. En general, la migración celular puede ser visualizada como un proceso cíclico. La respuesta inicial de una célula a un estímulo quimioatrayente es la polarización y extensión de protusiones en la dirección del estímulo. Estas protusiones pueden ser amplias en forma de láminas llamadas lamelipodias, o puntiagudas en forma de espículas, mejor conocidas como filopodias. Las formaciones de estos frentes de migración son dirigidas y mantenidas por la polimerización de actina cortical y son estabilizados mediante la unión a la matriz extracelular (MEC) o células adyacentes a través de proteínas transmembranales que unen el citoesqueleto. Estas adhesiones sirven como sitios de tracción para la migración; por ello, continuamente son desensambladas en la parte posterior y ensambladas nuevamente en la parte anterior de la célula [55,56].

Durante la invasión y metástasis, las células cancerosas migran dentro de tejidos. En diversos tumores epiteliales mamarios, la migración celular puede llevarse a cabo de forma colectiva y/o individual. En la migración colectiva, las células se mueven conjuntamente mediante estructuras laminares de actina, encontrándose las uniones célula-célula presentes. Por otro lado, en la migración individual, las uniones célula-célula son suprimidas y las células cancerosas migran de manera individual, siendo una característica durante la angiogénesis y progresión tumoral, donde células de origen epitelial son capaces de migrar individualmente mediante una TEM. En consecuencia, las células de cáncer de mama muestran distintos modos de migración de acuerdo con el estado de diferenciación. Por otra parte, las proteínas de unión a actina regulan el ensamble y desensamble de filamentos de actina durante la migración celular. Esta dinámica es controlada por una variedad de mecanismos de señalización intracelular en donde miembros de la subfamilia de proteínas pequeñas de unión a GTP (GTPasas) Rho tienen un papel central en la motilidad de células cancerosas. Las proteínas Rac, Rho y Cdc42 son tres miembros de la familia de GTPasas Rho que actúan como interruptores moleculares que ciclan entre estados de unión a GDP y GTP. La forma unida a GTP representa la forma activa de la proteína regulando efectores específicos río abajo para modular la motilidad celular. Específicamente, Rac induce formación de complejos y polimerización de

actina durante la formación de lamelipodias; Rho induce la formación de fibras de estrés, mientras que Cdc42 induce la formación de filopodias [56–58].

### **Invasión celular en cáncer**

La metástasis comienza con la invasión de células tumorales hacia el estroma y posterior migración hacia el torrente sanguíneo y/o linfático. La invasión celular a través de diferentes capas de matriz extracelular es un paso clave en la metástasis del tumor. En cánceres de tipo epitelial humanos tales como el cáncer de mama, las células invasoras presentan con frecuencia marcadores de TEM, mostrando una regulación negativa en la expresión de E-cadherina y una regulación positiva en la expresión de vimentina, generando una pérdida de características epiteliales, tales como una pérdida de polaridad apical-basal. Durante la progresión tumoral, el estroma, el cual rodea el tejido epitelial, también sufre cambios drásticos. El estroma se compone principalmente por redes de colágeno tipo I. Durante etapas tempranas de la progresión tumoral la cantidad de colágeno en el estroma incrementa, las fibras de colágeno se organizan en un orden con características más rígidas, lineales y orientadas perpendicularmente hacia la membrana basal, proporcionando vías de escape para que células migren fuera del tumor primario [59,60].

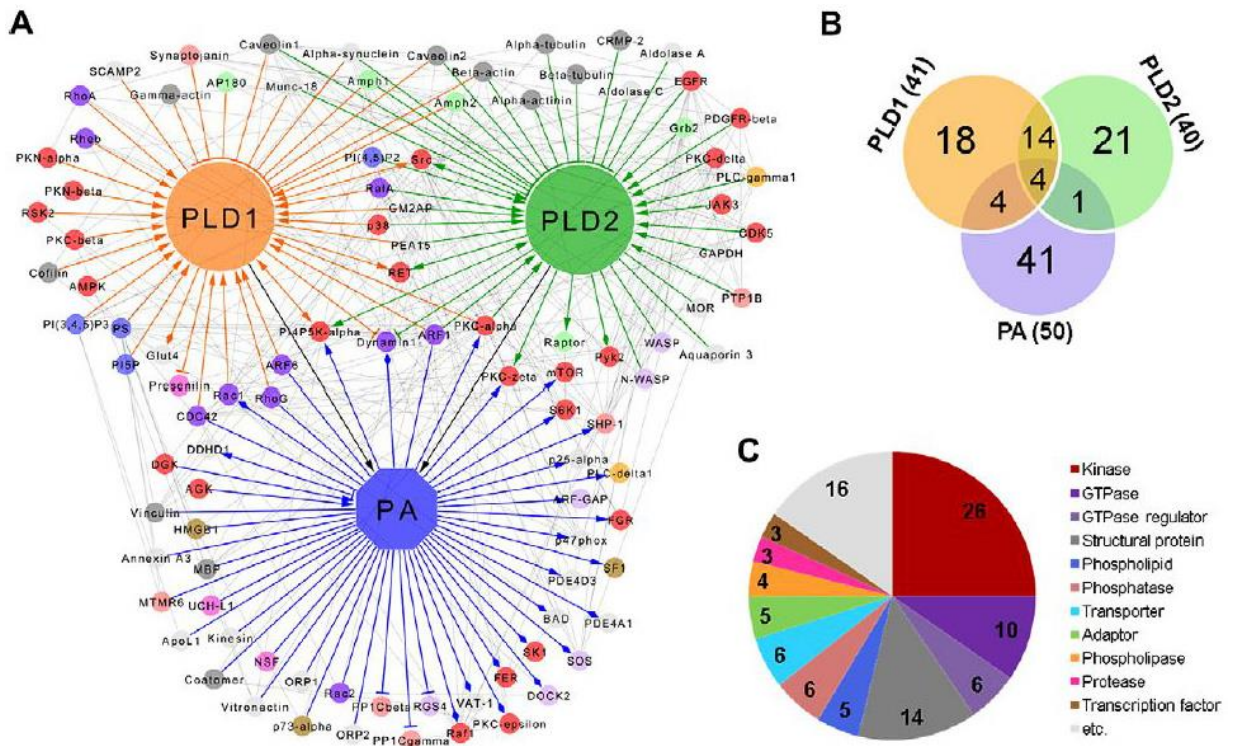
La progresión del tumor mamario involucra una serie de cambios genéticos y epigenéticos como consecuencia de una inestabilidad genética, conllevando a presentar perfiles fenotípicos heterogéneos entre células de un mismo tumor. Las etapas de invasión incluyen adhesión a la matriz, degradación de moléculas de la matriz proximal, extensión y tracción de la célula en la nueva matriz proximal, así como movimiento del cuerpo celular a través de la brecha resultante en la matriz. Cada una de estas etapas es ejecutada sistémicamente por una regulación conjunta de proteínas que incluyen moléculas de adhesión como: integrinas, cadherinas, selectinas y proteínas de unión a hialuronato; enzimas proteolíticas como la familia de activadores de plasminógeno, MMPs y de membrana (ADAMs); receptores a quimiocinas como CXCR4 y CCR7 y moléculas de señalización como la vía de la GTPasa Ras. La vía de Ras se encuentra íntimamente asociada a la progresión tumoral, incrementando la expresión y/o activación de proteínas clave en la invasión

de células tumorales mamarias, como PI3K/Akt, ERK1/2, fosfolipasa D (PLD) y NFκB [59–61].

### **Fosfolipasa D**

La generación de segundos mensajeros lipídicos en el sitio de interacción ligando-receptor se desarrolla como una forma para generar respuestas rápidas, variadas y complejas a señales extracelulares, siendo las enzimas que metabolizan fosfolípidos las que frecuentemente están implicadas en la transducción de señales intracelulares. En este sentido, PLD es una enzima clave en procesos tumorales desencadenados por factores de crecimiento, como migración e invasión celular. PLD es una enzima que hidroliza fosfolípidos de membrana, en especial fosfatidilcolina, para producir colina y ácido fosfatídico (AF). El AF es un segundo mensajero lipídico involucrado en el reclutamiento de proteínas citosólicas a la membrana, donde pueden ser activadas para potenciar múltiples vías de señalización asociadas al crecimiento, proliferación y reorganización del citoesqueleto, se han descrito 58 proteínas y 5 lípidos que interactúan con PLD, mientras que AF tiene al menos 50 proteínas efectoras (Figura 3). PLD presenta dos isoformas, PLD1 y PLD2, codificadas por dos genes diferentes. Generalmente PLD1 se localiza en membranas intracelulares y no presenta actividad basal, su activación está regulada por señales extracelulares, siendo reclutada rápidamente a membrana plasmática; mientras que PLD2 se localiza en membrana plasmática y presenta actividad basal, siendo sensible a los activadores de PLD1. PLD participa en muchos procesos biológicos tales como proliferación, sobrevivencia, migración celular y tráfico vesicular, estando su expresión relacionada con la carcinogénesis. Isoformas de PLD pueden ser activadas por una variedad de mitógenos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), insulina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina-1β (IL-1β) y suero; adicionalmente, PLD2 puede ser activada por AGs insaturados. La actividad de PLD es regulada por proteínas intracelulares como PKC y/o proteínas G pequeñas de la familia de Rho y Arf. Los niveles endógenos de AF son bajos en células en reposo, variando en relación a la actividad de PLD, la cual está

fuertemente regulada por mecanismos que controlan la sobrevivencia, proliferación y ciclo celular. En humanos, PLD se expresa en casi todos los tipos celulares, estando la expresión y actividad de ambas isoformas asociada a diferentes tipos de cáncer humano, incluyendo colón, gástrico, renal y de mama. En cáncer de mama, existe una correlación entre el incremento en la expresión y actividad de PLD y una pérdida del receptor de estrógenos durante la evolución tumoral. Estudios *in vivo* en un modelo de ratón SCID xenotrasplantados con células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, se demostró la participación de la isoforma PLD2 en el desarrollo de tumores de mama y metástasis. Por otro lado, en células de cáncer de mama MDA-MB-231, la generación de AF dependiente de PLD tiene un efecto promotor de la migración al inducir la activación del eje de señalización Ras-ERK/PI3K-NFκB, incrementando la expresión de MMPs y PLD1, así como un efecto positivo en la inducción de la invasión [62–67].



**Figura 3. Patrones de interacción de PLD y AF [68].** A) Proteínas que interactúan con PLD y AF. B) Diagrama de Venn que muestra patrones de unión comunes entre PLD1, PLD2 y AF. C) Función molecular de proteínas efectoras de PLD y AF.

## **Factor nuclear $\kappa$ B**

El factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) es un factor de transcripción que controla la expresión de más de 500 genes involucrados en diversas respuestas fisiológicas. Una desregulación de la actividad de este factor está asociado al proceso tumoral, puesto que regula la expresión de genes asociados a migración celular y degradación de MEC. NF $\kappa$ B pertenece a la familia de proteínas Rel que incluyen c-Rel, Rel-A (p65), Relb, NF $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105) y NF $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100), formando homo o heterodímeros. Durante el arresto celular, NF $\kappa$ B se mantiene en citoplasma en asociación con la proteína inhibitoria I $\kappa$ B. En la vía clásica de activación, el complejo de cinasas de I $\kappa$ B (I $\kappa$ K) fosforilan I $\kappa$ B en dos residuos de serina conservados (Ser-30 y Ser-32), una vez fosforilados, sirven como señal para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma 26S. Este proceso libera a NF $\kappa$ B permitiendo su translocación al núcleo y su unión al ADN, modulando así, la transcripción de genes que regulan inmunidad, comunicación celular, supervivencia, proliferación y la propia auto-regulación de la proteína [69,70]. En células de cáncer de mama, la activación de NF $\kappa$ B inducida por factores de crecimiento promueve su unión a la secuencia promotora del gen de PLD1 promoviendo su expresión y consecuentemente un incremento en la invasión a través de la secreción de MMPs. Por otro lado, en células de epitelio mamario no tumorales MCF-10A, el AL induce un proceso de TEM acompañado por la activación de NF $\kappa$ B [71].

## **JUSTIFICACIÓN**

Desde hace varias décadas los tumores malignos se han posicionado en los primeros sitios como causa de mortalidad a nivel mundial, representando un gran desafío para las economías y sistemas de salud. Bajo este contexto, el cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con más frecuencia en mujeres alrededor del mundo y constituye la principal causa de muerte por cáncer, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial.

De acuerdo con evidencia derivada de estudios epidemiológicos y experimentales en modelos animales, existen diversos factores de riesgo para el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Uno de los factores que ha cobrado gran relevancia en los últimos años es el relacionado con el alto consumo de azúcares y ácidos grasos, característico de tipos de dieta definidas como “occidentales”. Este hábito alimenticio conlleva a estados de sobrepeso y obesidad, que se caracterizan por hiperlipidemias y altas concentraciones de ácidos grasos libres en circulación sanguínea. Diversos trabajos experimentales han demostrado el papel de los ácidos grasos en procesos clave de la progresión tumoral como proliferación, evasión de apoptosis, migración e invasión celular. Estos trabajos han demostrado la participación de varias vías de señalización; sin embargo, estudios adicionales son necesarios para entender los mecanismos específicos involucrados en estos eventos, específicamente las vías de transducción de señales desencadenadas por el AL, principal constituyente de los aceites vegetales, ampliamente utilizados en dietas occidentales.

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



## **HIPÓTESIS**

La migración e invasión inducida por AL en células de cáncer de mama es dependiente de la actividad de PLD.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la participación de PLD en la migración e invasión celular inducida por AL en células cancerosas mamarias

### **Objetivos particulares**

- 1) Determinar el papel de PLD en la migración e invasión celular inducida por AL en la línea celular MDA-MB-231.
- 2) Evaluar la participación de FFAR1, FFAR4 y EGFR en la activación de PLD y en los procesos de migración e invasión inducidos por AL.
- 3) Determinar el papel de FFAR1, FFAR4, EGFR y PLD en la activación de NFκB inducida por AL.
- 4) Analizar el efecto del AL sobre el crecimiento de células cancerosas mamarias en un cultivo 3D.
- 5) Evaluar el efecto del AL en células cancerosas mamarias MCF-7.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material y reactivos**

Linoleato de sodio (AL), DC260126, forbol 12,13-dibutirato (PDB), 1-butanol (BtOH) y *tert*-butanol (*tert*-BtOH) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis MO). AH7614 fue obtenido de TOCRIS (Minneapolis, MN). Anticuerpos (Abs) anti-Akt2, anti-EGFR y anti-P-Tyr, así como VU0155069 y CAY10594 fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). AG1478 fue obtenido de Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA). Ab anti-P-Akt (Ser-473) fue obtenido de Cell Signaling y Ab anti-actina fue proporcionado por el Dr Manuel Hernandez (Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN). Matriz de membrana basal (BD Matrigel) fue obtenido de BD Biosciences (Bedford, MA, USA). Colágeno tipo I fue obtenido de Costar, Corning Inc (NY, USA).

### **Cultivo celular**

Las líneas celulares de cáncer mamario 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 atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire a 37 °C. Para fines experimentales las células fueron sujetas a privación de suero por 16 h antes del tratamiento con inhibidores y/o AL.

### **Estimulación celular**

Cultivos confluentes fueron lavados dos veces con solución de PBS, equilibrados en DMEM a 37 °C por al menos 30 min. Posteriormente, los cultivos fueron tratados con inhibidores y/o AL por varios tiempos según las condiciones establecidas. La estimulación celular fue finalizada aspirando el medio de cultivo y las células fueron solubilizadas sobre hielo con 0.5 mL de solución amortiguadora de lisis RIPA (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 100 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 1%, desoxicolato de sodio 0.3%, MgCl 1.5 mM, SDS 0.1% y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM).

### **Ensayo de viabilidad celular**

Células MDA-MB-231 fueron cultivadas por 72 h y posteriormente incubadas por 48 h con los diferentes inhibidores utilizados en este estudio. Posteriormente, las células fueron incubadas con el reactivo WST-1 (Sigma-Aldrich) por 2 h a 37 °C. Al finalizar, la absorbancia fue cuantificada a 450 nm y los resultados fueron normalizados con respecto a células sin estimulación.

### **Ensayo de actividad de PLD**

Las células fueron cultivadas por 72 h y posteriormente estimuladas con las condiciones correspondientes. Al término del estímulo, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con 150 µl de solución de ensayo (Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, NaF 3.2 mM, IGEPAL 0.1%, desoxicolato de sodio 0.3%, pH 8). A continuación, 50 µl del lisado total fue incubado por 1 h a 37 °C con enzima colina oxidasa (*Phospholipase D Activity Assay Kit*; Sigma-Aldrich). Posteriormente, se evaluó la actividad de PLD mediante absorbancia a 570 nm. Una curva de calibración fue generada con diferentes concentraciones de colina. Todos los resultados fueron normalizados con respecto a la concentración de proteínas totales en el lisado celular.

### **Ensayos de inmunoprecipitación e inmunodetección (WB)**

Lisados celulares fueron centrifugados a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C y los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos. Las concentraciones de proteínas fueron determinadas mediante ensayo de Bradford (BioRad). Posteriormente, cantidades iguales de proteína fueron inmunoprecipitadas toda la noche a 4 °C con proteína A-agarosa unida al Ab primario, específico para la proteína de interés. Los inmunoprecipitados fueron lavados tres veces con solución amortiguadora RIPA y separados por SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 10%, seguido de transferencia a membranas de nitrocelulosa. Posterior a la transferencia, las membranas fueron bloqueadas usando 5% de leche libre de grasas en PBS pH 7.2/0.1% Tween 20 (solución de lavado), y fueron incubadas toda la noche a 4 °C con Ab primario. Las membranas fueron lavadas tres veces con solución de lavado e incubadas con Ab secundario (Ab conjugado con peroxidasa de rábano) 1:5000 por 2 h a 22 °C. Después de los lavados correspondientes, las bandas

inmunoreactivas fueron visualizadas usando reactivo de detección ECL. Los autoradiogramas fueron escaneados y las bandas fueron cuantificadas usando el programa ImageJ (NIH, USA).

### **Ensayo de cierre de herida por rayadura**

Las células fueron crecidas a confluencia en placas de cultivo, incubadas en medio DMEM sin SFB e incubadas con 12  $\mu\text{M}$  de mitomicina C por 2 h para inhibir proliferación durante el experimento. Posteriormente, una rayadura fue realizada sobre la monocapa de los cultivos celulares usando una punta de pipeta estéril de 200  $\mu\text{l}$ . Los cultivos fueron lavados tres veces con PBS e incubados con medio DMEM sin SFB en ausencia o presencia de inhibidores y/o AL. El progreso de la migración celular fue monitoreado y fotografiado en los tiempos establecidos usando un microscopio invertido acoplado a una cámara. Cada experimento fue repetido tres veces. La migración celular fue evaluada usando el programa ImageJ (NIH, USA).

### **Ensayos de migración quimiotáctica e invasión celular (método de cámara de Boyden)**

Los ensayos de migración quimiotáctica e invasión celular fueron realizados mediante el método de cámara de Boyden modificado en placas de 24 pozos conteniendo 12 insertos de cultivo celular con poros de 8  $\mu\text{m}$  de tamaño (Costar, Corning Inc). Para los ensayos de invasión, 50  $\mu\text{l}$  de matrigel (3 mg/mL) fueron agregados sobre la superficie de los insertos de cultivo e incubados por 2 h a 37°C. Las células fueron sembradas sobre la parte superior de la cámara a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/inserto en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de medio libre de SFB, mientras que en la parte inferior de la cámara se colocaron 600  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo con inhibidores y/o AL. Posteriormente, las cámaras fueron incubadas por 48 h a 37 °C en una atmosfera con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Al finalizar la incubación, las células y el matrigel contenidas en la parte superior de la membrana fueron removidas con un hisopo de algodón y las células localizadas en la parte inferior de la membrana fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 min. El número de células que migraron/invadieron fueron estimadas mediante tinción de las membranas con cristal violeta al 0.1%. Las membranas fueron lavadas tres veces con PBS, fotografiadas y

el colorante fue eluído con 500  $\mu$ l de ácido acético al 30%, analizando por absorbancia a 600 nm. El valor del fondo fue obtenido a partir de pozos sin células.

### **Preparación de extractos nucleares**

Los extractos nucleares fueron preparados como se describe a continuación. Brevemente,  $1.5 \times 10^6$  células fueron lisadas en hielo con detergente no iónico Nonidet-P40 en solución amortiguadora A (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, NaF 10 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM). Los lisados celulares fueron centrifugados a 1,600 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante conteniendo los extractos citosólicos fue desechado, mientras que el precipitado, constituido por núcleos celulares intactos, fue lisado y resuspendido en solución amortiguadora B (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 420 mM, glicerol 20%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM). Los extractos nucleares fueron recuperados por centrifugación a 14,000 rpm por 15 min a 4 °C. Las proteínas fueron cuantificadas usando reactivo de Bradford.

### **Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)**

El ensayo de EMSA fue realizado utilizando oligonucleótidos de doble cadena con sitios específicos para NF $\kappa$ B (5'-AGCTAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGG-3') [72]. A continuación, 20 pmol del oligonucleótido fueron marcados con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP usando la enzima polinucleótido cinasa T4. El oligonucleótido marcado con <sup>32</sup>P fue incubado con 7  $\mu$ g de extracto nuclear en una solución de reacción que contenía 3  $\mu$ g de poli (dl-dC), HEPES 0.25 mM pH 7.5, KCl 0.6 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 7.5 mM y glicerol 9% durante 20 min a 4 °C. Un exceso de cien veces más de oligonucleótidos sin marcar radiactivamente con sitios específicos para NF $\kappa$ B y un oligonucleótido irrelevante fueron usados como competidores específico y no específico respectivamente. Las muestras fueron resueltas en geles con poliacrilamida al 6% en solución amortiguadora Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5X. Finalmente, el gel fue secado y analizado por autorradiografía.

## **Ensayo de formación de esferoides celulares en cajas de cultivo de baja adherencia**

Cultivos celulares al 80% de confluencia fueron colocados en suspensión mediante tratamiento con una solución de tripsina y suavemente pipeteadas para formar una suspensión de células individuales. La tripsina fue inactivada mediante adición de medio de cultivo conteniendo SFB y las células fueron colectadas por centrifugación. Las células fueron cuantificadas y sembradas a una concentración de 5,000 células por pozo en placas de cultivo de 6 pozos de baja adherencia (Costar, Inc). La formación y crecimiento de esferoides fue realizado en medio de cultivo con 1% de SFB por 5 días y posteriormente 90  $\mu$ M de AL y/o 0.3% de BtOH fueron agregados por otros 5 días. Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio invertido Carl Zeiss VERT.A1. El número de esferoides celulares fue estimado mediante análisis de fotografías con el programa ImageJ (NIH, USA).

## **Ensayo de formación de esferoides celulares en matrigel y colágeno tipo I**

Cultivos de esferoides celulares fueron realizados sobre una matriz de matrigel o colágeno tipo I. Brevemente, 500  $\mu$ l de matrigel (3 mg/mL) o colágeno tipo I (250  $\mu$ g/mL) fueron colocados con la punta de una pipeta sobre el fondo de una placa de cultivo de 24 pozos. Células MDA-MB-231 en suspensión fueron sembradas sobre la matriz con una densidad de 3,000 células por pozo. Después de 24 h, 90  $\mu$ M de AL y/o 0.3% de BtOH fue agregado y los esferoides fueron crecidos en medio de cultivo con 0.1% de SFB por 15 días. El estímulo con AL y/o BtOH fue renovado cada tercer día. Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio invertido Carl Zeiss VERT.A1. El número y área relativa de esferoides celulares fue estimado mediante análisis de fotografías con el programa ImageJ (NIH, USA).

## **Análisis estadístico**

Los experimentos fueron realizados al menos tres veces y los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SEM. Los datos fueron analizados estadísticamente usando una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Una probabilidad estadística de  $P < 0.05$  fue considerada significativa.

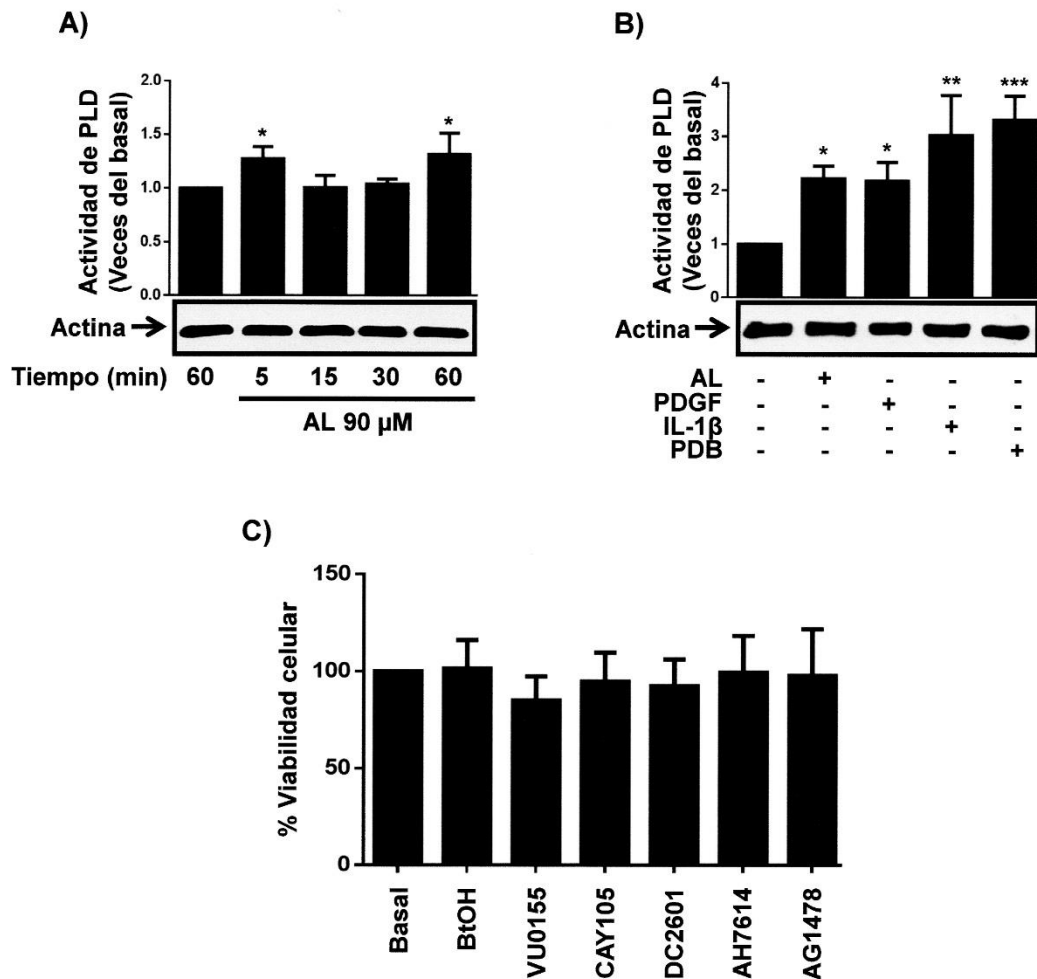
## RESULTADOS

### **AL induce un incremento en la actividad de PLD en células de cáncer de mama MDA-MB-231**

Para determinar si el AL induce activación de PLD, células MDA-MB-231 fueron estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por varios tiempos y la actividad de PLD fue determinada. Los resultados mostraron que el AL indujo la activación de PLD a los 5 y 60 min de estimulación comparado con el basal (Fig. 4A). Con el fin de sustentar este hallazgo, se determinó si otros estímulos extracelulares como PDGF, IL-1 $\beta$  y PDB, previamente demostrado que inducen la actividad de PLD en células de cáncer de mama [66,71], inducen activación de PLD en una manera similar al AL. Para ello, células MDA-MB-231 fueron incubadas con 90  $\mu$ M de AL por 5 min y con 20 ng/mL de PDGF, 10 ng/mL de IL-1 $\beta$  y 1  $\mu$ M de PDB por 30 min y la actividad de PLD fue analizada. Un Western blot con un Ab anti-actina fue incluido como control de carga. Los resultados demostraron que AL, PDGF, IL-1 $\beta$  y PDB inducen activación de PLD en células MDA-MB-231 (Fig. 4B).

Por otro lado, para evaluar posteriormente los procesos de migración e invasión, se determinó en primera instancia, si los inhibidores específicos para las proteínas de interés no afectan la viabilidad celular. De esta manera, células MDA-MB-231 fueron incubadas con BtOH, VU0155069, CAY10594, DC260126, AH7614 y AG1478, inhibidores de PLD, PLD1, PLD2, FFAR40, FFAR120 y EGFR, respectivamente. La citotoxicidad fue evaluada mediante ensayos de viabilidad celular. Como se ilustra en la Fig. 4C, la incubación con los diferentes inhibidores no afecta la viabilidad de las células MDA-MB-231.

**Figura 4**



**Figura 4. AL induce actividad de PLD en células de cáncer de mama MDA-MB-231.** Las gráficas representan la actividad de PLD en células MDA-MB-231 estimuladas con AL por varios tiempos (Panel A) o con AL por 5 min y con PDGF, IL-1β y PDB por 30 min (Panel B). Un Western blot con Ab anti-actina fue incluido como control de carga para los ensayos de actividad de PLD. Panel C. La gráfica representa el porcentaje de viabilidad celular evaluada en células MDA-MB-231 incubadas por 48 h con los inhibidores BtOH, *tert*-BtOH, VU0155069, CAY10594, DC260126, AH7614 o AG1478. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

### Participación de PLD en los procesos de migración e invasión celular inducidos por AL

Debido a que el AL induce migración e invasión celular [34,35], así como activación de PLD en células MDA-MB-231, se evaluó el papel de esta fosfolipasa en el proceso de migración inducido por AL en células cancerosas mamarias MDA-MB-231. En primer lugar, evaluamos el papel de PLD mediante tratamiento con



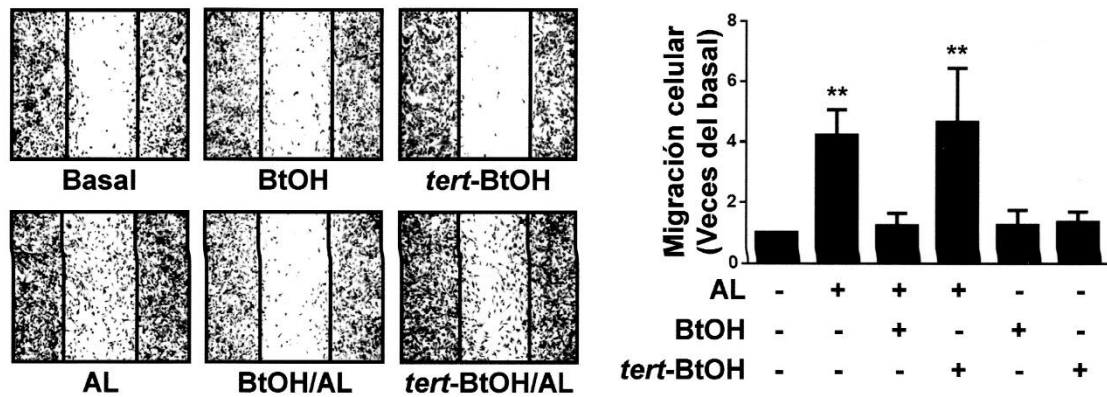
BtOH, un alcohol primario que actúa como sustrato para PLD en la reacción de transfosfatidilación, generando fosfatidilalcoholes en lugar de AF, inhibiendo así, la actividad de PLD [73]. Para ello, cultivos de células MDA-MB-231 fueron incubados con 12  $\mu$ M de mitomicina C por 2 h. Posteriormente se realizó una rayadura sobre la monocapa y las células fueron incubadas con 0.3% BtOH, 0.3% *tert*-BtOH y/o 90  $\mu$ M de AL por 48 h, tiempo de estimulación en el cual el AL induce migración en esta línea celular [34]. El *tert*-BtOH fue incluido como control negativo de BtOH, ya que es un análogo estructural que no representa un sustrato para PLD. Como se muestra en la Fig. 5A, el tratamiento con BtOH inhibió la migración inducida por AL en células MDA-MB-231; mientras que el tratamiento con *tert*-BtOH no tuvo ningún efecto.

Para fundamentar los resultados anteriores, se realizaron ensayos de migración celular quimiotáctica mediante el método de cámara de Boyden. Para ello, células MDA-MB-231 fueron incubadas con 0.3% BtOH y/o 90  $\mu$ M de AL por 48 h. Los resultados mostraron que el tratamiento con BtOH inhibió la migración celular inducida por AL en células MDA-MB-231 (Fig. 5B).

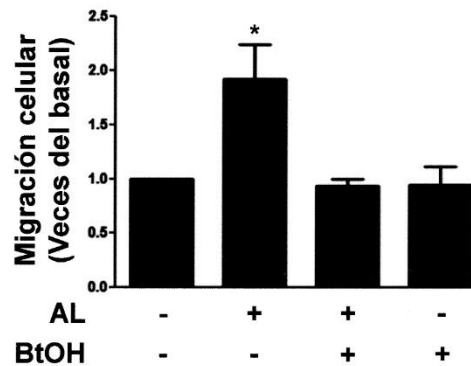
Considerando que la capacidad migratoria es una característica que las células tumorales adquieren durante la invasión hacia tejidos adyacentes, se evaluó si PLD regula la invasión inducida por AL en células MDA-MB-231. Con este fin, ensayos de invasión en cámara de Boyden fueron realizados con células MDA-MB-231 incubadas previamente con 0.3% BtOH y estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por 48 h. Como se muestra en las imágenes de la Fig. 5C, cuando las células fueron incubadas en presencia del inhibidor BtOH, la invasión inducida por AL fue bloqueada. En conjunto, estos resultados demostraron que la migración e invasión inducida por AL en células MDA-MB-231 requiere actividad de PLD.

**Figura 5**

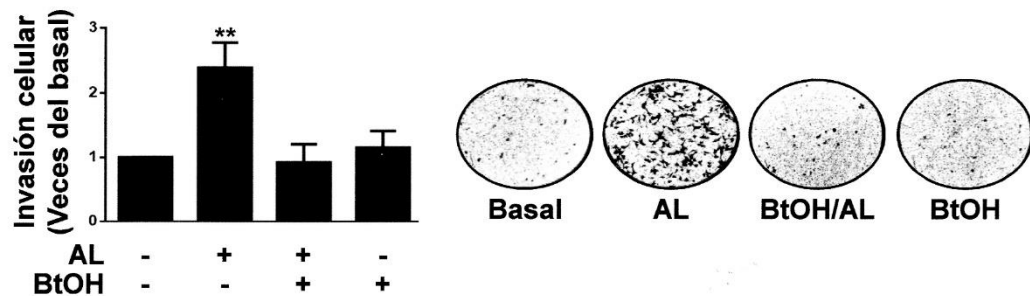
**A)**



**B)**



**C)**



**Figura 5. Migración e invasión celular inducida por AL requiere la actividad de PLD.** Panel A. Migración de células MDA-MB-231 estimuladas con AL e incubadas previamente con BtOH o *tert*-BtOH en ensayos de cierre de herida. La gráfica representa la migración de células hacia el área abierta de la rayadura. Panel B. La gráfica representa el índice de migración quimiotáctica en cámara de Boyden de células MDA-MB-231 incubadas previamente con BtOH y estimuladas con AL. Panel C. Índice de invasión de células MDA-MB-231 incubadas previamente con BtOH y estimuladas con AL. La gráfica representa la cuantificación de células que invadieron hacia la parte inferior de los insertos en cámaras de Boyden. Las fotografías fueron tomadas a las 48 h de estímulo. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

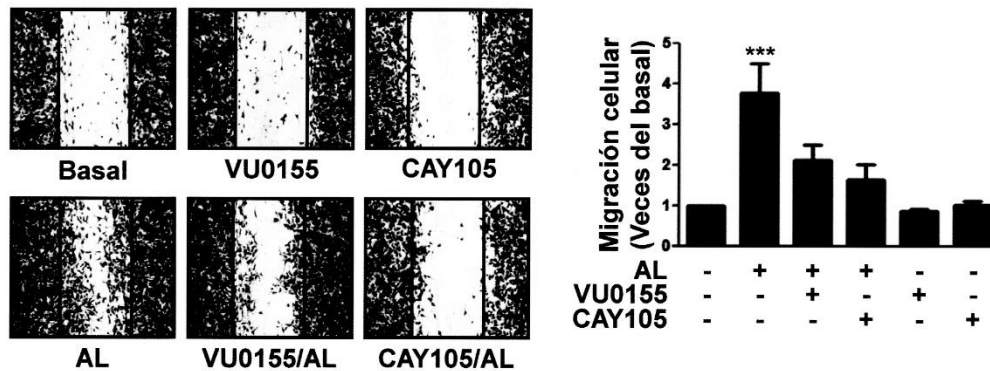
## **Papel de PLD1 y PLD2 en migración e invasión celular inducida por AL**

Para determinar el papel de PLD1 y PLD2 en el proceso de migración celular inducido por AL en células MDA-MB-231, ensayos de migración por cierre de herida y migración quimiotáctica en cámara de Boyden fueron realizados. Para ello, células MDA-MB-231 fueron incubadas por 2 h con 5  $\mu$ M VU0155069 y 1  $\mu$ M CAY10594, los cuales son inhibidores de PLD1 y PLD2 respectivamente [74,75], posteriormente, fueron estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por 48 h. Los resultados demostraron que la inhibición de la actividad de PLD1 y PLD2 inhiben la migración inducida por AL en células MDA-MB-231 (Fig. 6A y 6B).

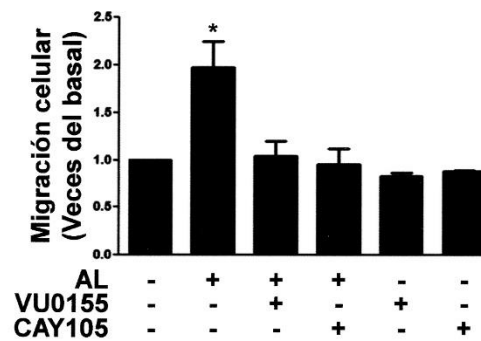
Posteriormente, se analizó si PLD1 y/o PLD2 regulan invasión celular. Para ello, ensayos de invasión en cámara de Boyden fueron realizados con células MDA-MB-231 tratadas con 5  $\mu$ M VU0155069 y 1  $\mu$ M CAY10594 y estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por 48 h. Como se muestra en la Fig. 6C, el tratamiento con VU0155069 completamente inhibió la invasión, mientras que el tratamiento con CAY10594 parcialmente inhibió la invasión celular inducida por AL en células MDA-MB-231. En conjunto, ambas isoformas de PLD participan en procesos de migración e invasión celular inducidos por AL.

**Figura 6**

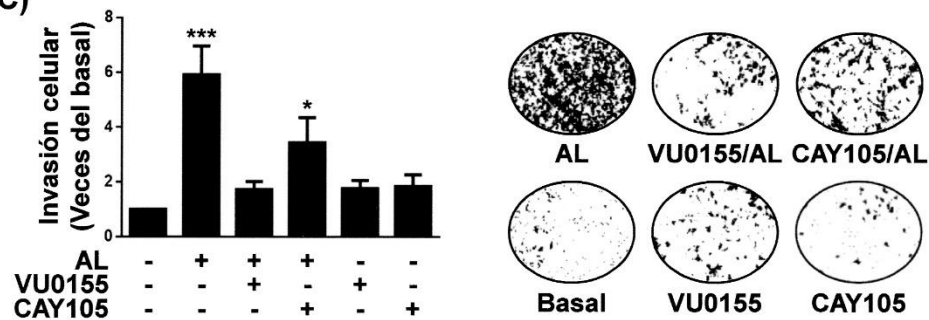
**A)**



**B)**



**C)**



**Figura 6. Papel de PLD1 y PLD2 en la migración e invasión celular inducida por AL.** Panel A. Migración de células MDA-MB-231 estimuladas con AL e incubadas previamente con VU0155069 o CAY10594. La gráfica representa el índice de migración celular hacia el área abierta de la rayadura. Panel B. La gráfica representa el índice de migración quimiotáctica en cámara de Boyden de células MDA-MB-231 incubadas con VU0155069 o CAY10594 y estimuladas con AL. Panel C. Índice de invasión de células MDA-MB-231 incubadas previamente con VU0155069 o CAY10594 y estimuladas con AL. La gráfica representa la cuantificación de células que invadieron hacia la parte inferior de los insertos en cámaras de Boyden. Las fotografías fueron tomadas a las 48 h de estímulo en ensayos de migración e invasión celular. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

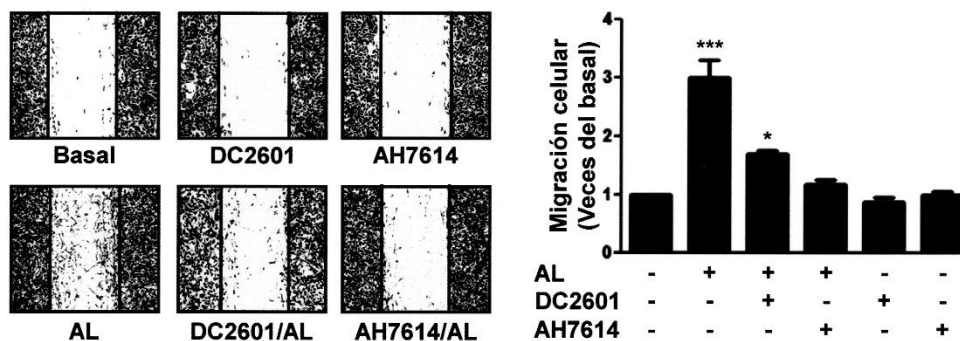
## **Papel de FFAR1 y FFAR4 en la activación de PLD, migración e invasión celular inducida por AL**

Considerando que los GPCRs FFAR1 y FFAR4, son receptores celulares para el AL y, además, se encuentran expresados en células de cáncer de mama [43,44,48,49], estudiamos el papel de FFAR1 y FFAR4 en la migración e invasión celular inducida por AL. Primero, ensayos de migración e invasión fueron realizados con células MDA-MB-231 incubadas por 1 h con 3  $\mu$ M DC260126 y 20  $\mu$ M AH7614, los cuales son inhibidores de FFAR1 y FFAR4 respectivamente [76,77], estimuladas a continuación con 90  $\mu$ M de AL por 48 h. Los resultados indicaron que la inhibición de FFAR1 inhibió parcialmente la migración, mientras que la inhibición de FFAR4 abatió completamente la migración inducida por AL en células MDA-MB-231 (Fig. 7A). En relación con la invasión, la inhibición de FFAR1 inhibió por completo la invasión, mientras que la inhibición de FFAR4 inhibió parcialmente la invasión inducida por AL (Fig. 7B).

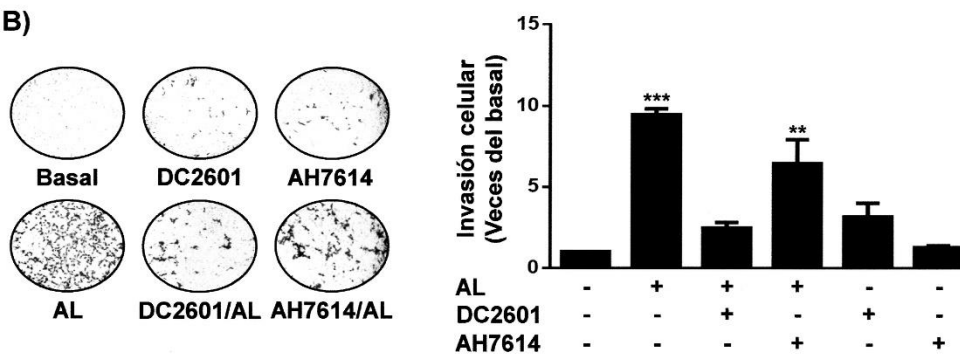
Dado que el AL induce activación de PLD y, que FFAR1 y FFAR4 participan en migración e invasión celular inducida por AL, se analizó el papel de estos receptores en la activación de PLD dependiente del AL. Con este fin, células MDA-MB-231 fueron incubadas por 1 h con 3  $\mu$ M DC260126 y/o 20  $\mu$ M AH7614 y posteriormente estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por 5 min. Al finalizar el estímulo, la actividad de PLD fue analizada. La inhibición tanto de FFAR1 como de FFAR4 inhibió de manera parcial la actividad de PLD. Sin embargo, cuando se inhibieron ambos receptores, se inhibió por completo el incremento en la actividad de PLD inducida por AL en células MDA-MB-231 (Fig. 7C). En conclusión, la actividad de PLD, así como los procesos de migración e invasión inducidos por AL en células de cáncer de mama MDA-MB-231 son dependientes de ambos receptores FFAR1 y FFAR4.

**Figura 7**

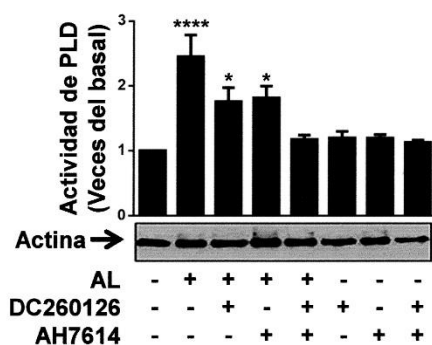
**A)**



**B)**



**C)**



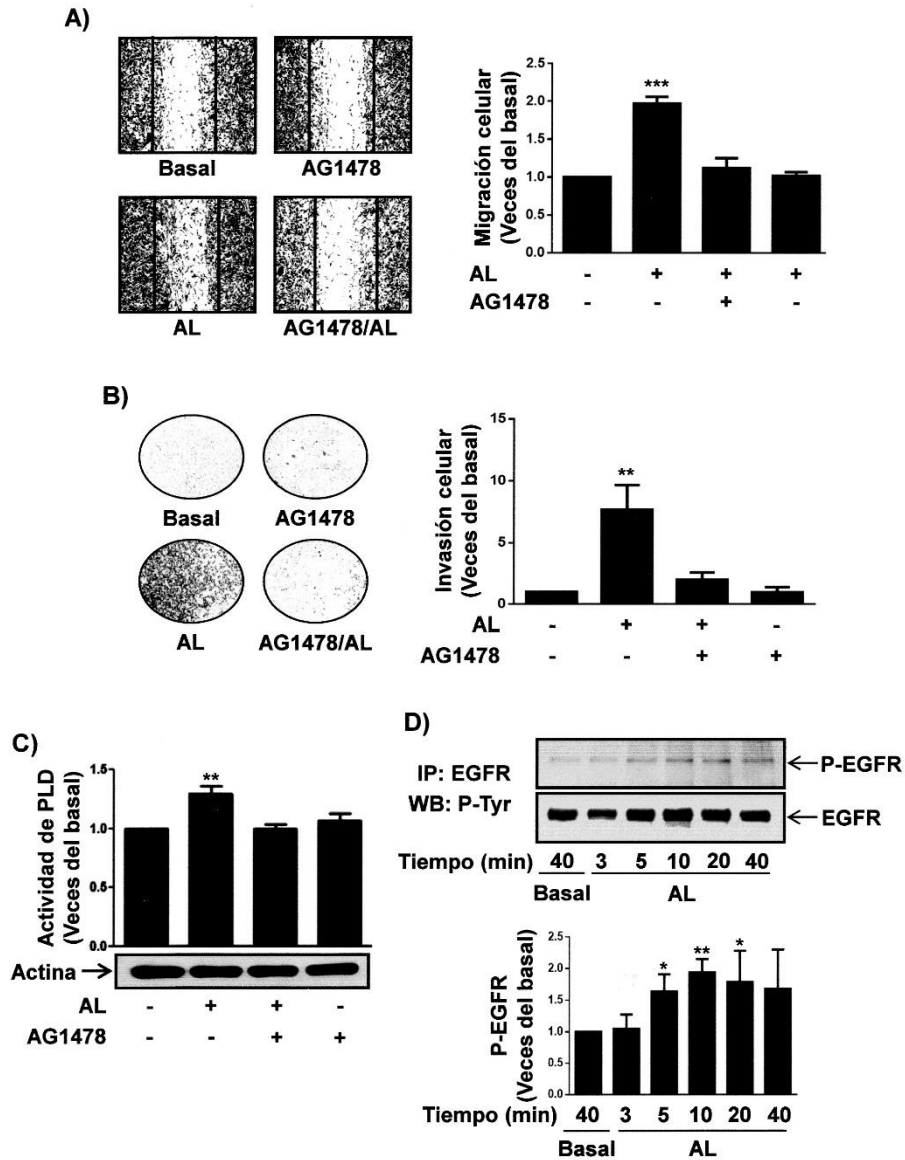
**Figura 7. Papel de FFAR1/FFAR4 en el proceso de migración e invasión celular y la actividad de PLD inducida por AL.** Panel A. Migración de células MDA-MB-231 estimuladas con AL e incubadas previamente con DC260126 o AH7614. La gráfica representa el índice de migración celular hacia el área abierta de la rayadura. Panel B. Índice de invasión de células MDA-MB-231 incubadas previamente con DC260126 o AH7614 y estimuladas con AL. La gráfica representa la cuantificación de células que invadieron hacia la parte inferior de los insertos en cámaras de Boyden. Las fotografías fueron tomadas a las 48 h de estímulo en ensayos de migración e invasión celular. Panel C. La gráfica representa la actividad de PLD en células MDA-MB-231 incubadas previamente con DC260126 y/o AH7614 y estimuladas con AL por 5 min. Un Western blot con un Ab anti-actina fue incluido como control de carga para el ensayo de actividad de PLD. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001.

## **Migración e invasión inducida por AL en células de cáncer de mama requiere la actividad de EGFR**

Reportes previos de nuestro laboratorio han indicado que el AL puede utilizar como intermediario en su señalización al EGFR en células de cáncer de mama [35]. Por ello, se analizó la participación de EGFR en los procesos de migración e invasión, así como en la activación de PLD inducidos por AL. Para cumplir con este objetivo, ensayos de migración e invasión celular fueron realizados utilizando 500 nM AG1478, inhibidor específico de EGFR [78], previo al estímulo con AL 90  $\mu$ M. En concordancia con reportes previos, el inhibidor del EGFR abatió completamente la migración e invasión celular inducida por AL (Fig. 8A y 8B).

De acuerdo a los resultados previos, se analizó si el EGFR participa en la activación de PLD inducida por AL. Por ello, las células MDA-MB-231 fueron incubadas por 30 min con 500 nM AG1478 y posteriormente estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por 5 min. Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición de EGFR inhibió por completo la actividad de PLD inducida por AL (Fig. 8C). Con el fin de sustentar estos resultados, se determinó si el AL induce activación del EGFR, la cual está dictada por su fosforilación en residuos de tirosinas [79]. Para esto, células MDA-MB-231 fueron estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por varios tiempos y lisadas. Los lisados fueron inmunoprecipitados con un Ab específico para EGFR y los complejos precipitados fueron analizados con un Ab anti-P-Tyr. Como se muestra en la Fig. 8D, el AL indujo fosforilación en residuos de tirosinas del EGFR. En conjunto, los resultados demostraron que la actividad de PLD, así como la migración e invasión inducida por AL en células MDA-MB-231 requieren activación del EGFR.

**Figura 8**



**Figura 8. Papel de EGFR en migración e invasión celular y actividad de PLD inducida por AL.** Panel A. Migración de células MDA-MB-231 estimuladas con AL e incubadas previamente con AG1478. La gráfica representa el índice de migración celular hacia el área abierta de la rayadura. Panel B. Índice de invasión de células MDA-MB-231 incubadas previamente con AG1478 y estimuladas con AL. La gráfica representa la cuantificación de células que invadieron hacia la parte inferior de los insertos en cámaras de Boyden. Las fotografías fueron tomadas a las 48 h de estímulo en ensayos de migración e invasión celular. Panel C. La gráfica representa la actividad de PLD en células MDA-MB-231 incubadas previamente con AG1478 y estimuladas con AL por 5 min. Un Western blot con un Ab anti-actina fue incluido como control de carga para el ensayo de actividad de PLD. Panel D. Niveles de la proteína EGFR total y de P-EGFR en células MDA-MB-231 estimuladas con AL por varios tiempos y detectados por inmunoprecipitación con un Ab anti-EGFR, seguido de Western blot usando un Ab anti-P-Tyr. La gráfica representa el análisis densitométrico de los niveles de P-EGFR con respecto a la proteína EGFR total. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

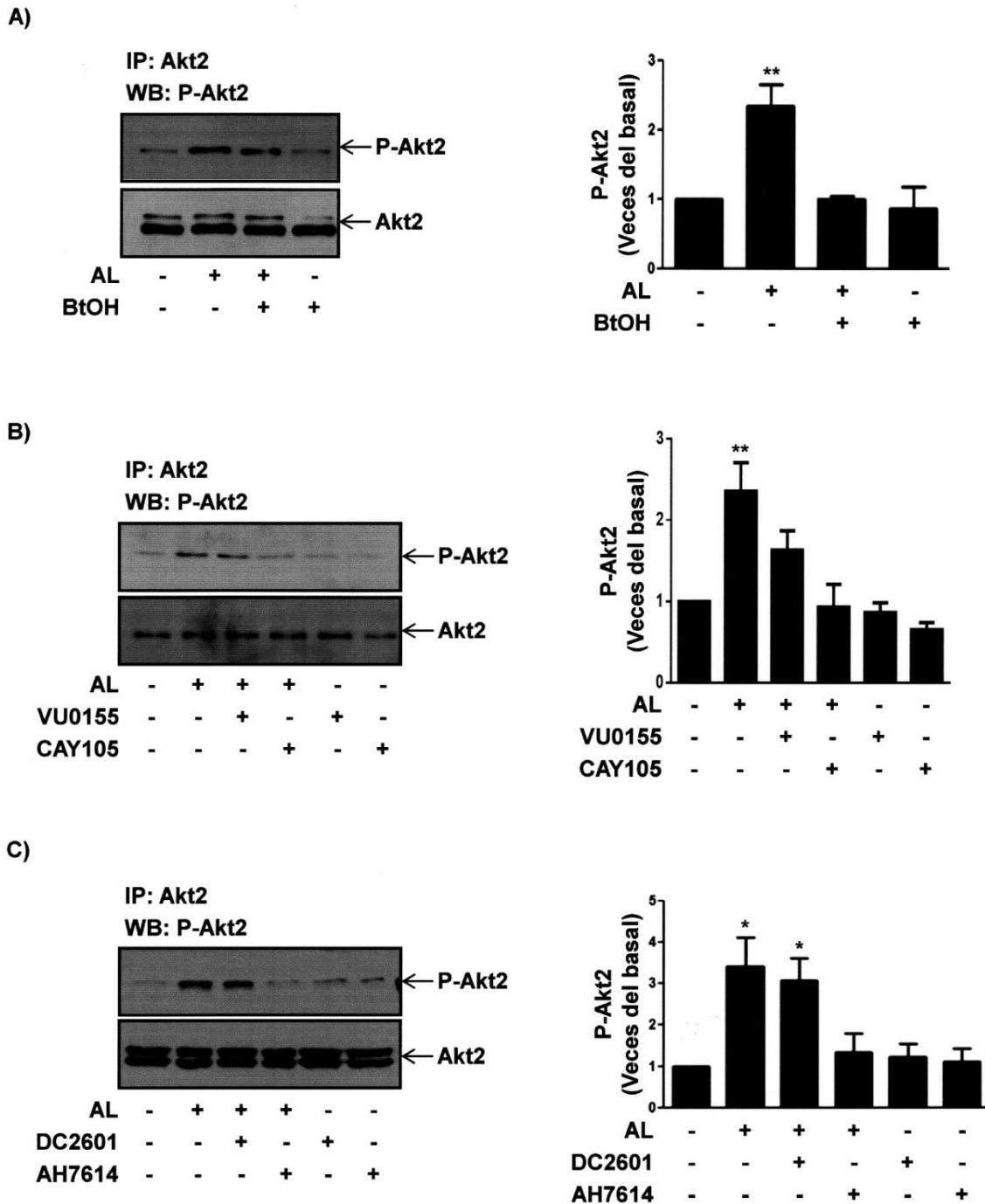


## **Participación de FFAR4 y PLD en la activación de Akt2 dependiente de AL**

Dado que el AL induce la activación de la proteína Akt2 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 [35], se analizó si FFARs e isoformas de PLD participan en la activación de Akt2. En primera instancia, células MDA-MB-231 fueron incubadas por 2 h con 0.3% BtOH, 5  $\mu$ M VU0155069 o 1  $\mu$ M CAY10594, inhibidores de PLD, y posteriormente estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por 5 min, tiempo de estimulación en el cual el AL induce fosforilación de Akt2 en esta línea celular [35]. Como se muestra en las Fig. 9A y Fig. 9B, la inhibición general de PLD, así como inhibición específica de PLD1 y PLD2 abaten fosforilación de Akt2 inducida por AL en células MDA-MB-231.

Para analizar el papel de FFAR1 y FFAR4 en la activación de Akt2 en células MDA-MB-231 estimuladas con AL, cultivos de células MDA-MB-231 fueron incubados por 1 h con 3  $\mu$ M DC260126 o 20  $\mu$ M AH7614, inhibidores de FFAR1 y FFAR4 respectivamente. Posteriormente, las células fueron estimuladas con 90  $\mu$ M de AL por 5 min. Los resultados mostraron que la inhibición de FFAR4 abatió la activación de Akt2 dependiente de AL. Sin embargo, la inhibición de FFAR1 no afectó la activación de Akt2 (Fig. 9C). En conjunto, estos resultados indican que la activación de Akt2 inducida por AL en células MDA-MB-231 requiere participación de FFAR4 y actividad de ambas isoformas de PLD.

**Figura 9**



**Figura 9. PLD1/PLD2 y FFAR4 modulan activación de Akt2 dependiente de AL en células MDA-MB-231.** Niveles de la proteína Akt2 total y de P-Akt2 en células MDA-MB-231 incubadas previamente ya sea con BtOH (Panel A), VU0155069 o CAY10594 (Panel B), o con DC260126 o AH7614 (Panel C), y posteriormente estimuladas con AL por 5 min. La detección de la proteína se realizó por inmunoprecipitación con un Ab anti-Akt2, seguido de Western blot usando un Ab anti-P-Akt (Ser-473). Las gráficas representan el análisis densitométrico de los niveles de P-Akt2 con respecto a la proteína Akt2 total. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

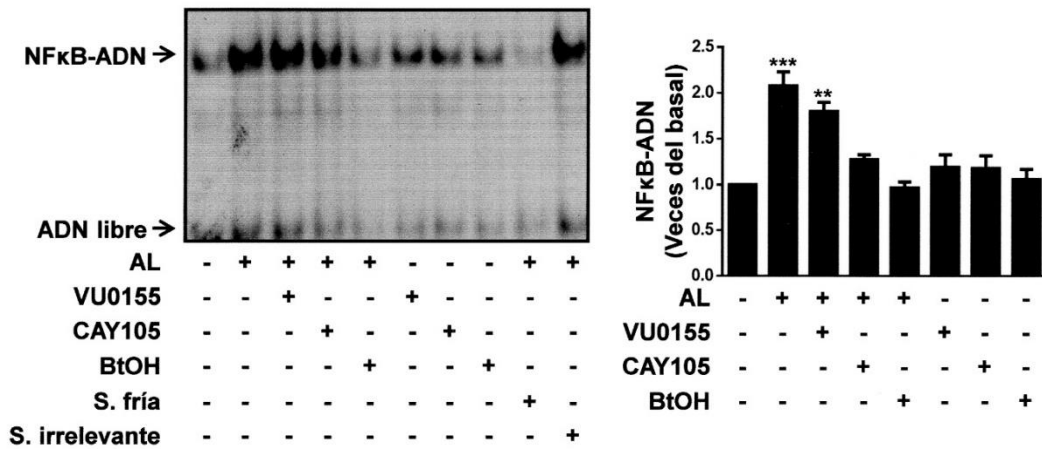
## **AL promueve activación de NFκB a través de una vía que implica ambos FFAR1 y FFAR4, EGFR y PLD**

El factor de transcripción NFκB juega un papel principal durante la oncogénesis, normalmente se encuentra activo en diversos tipos de cáncer incluido el cáncer de mama. Un reporte previo indicó que el estímulo con AL por 1 h induce activación de NFκB en células MDA-MB-231 [35]. Por ello, se evaluó la participación de PLD en la activación de NFκB. Células MDA-MB-231 fueron incubadas por 2 h con 0.3% BtOH, 5 μM VU0155069 y 1 μM CAY10594, inhibidores de PLD, y posteriormente fueron estimuladas con 90 μM de AL por 1 h. La activación de NFκB fue analizada mediante EMSA. Los resultados obtenidos muestran que AL indujo la formación de complejos NFκB-ADN y este efecto se ve abatido completamente cuando se inhibió de manera general a PLD y de manera específica a PLD2, no obstante, la inhibición de PLD1 afectó de manera parcial la formación de complejos NFκB-ADN (Fig. 10A).

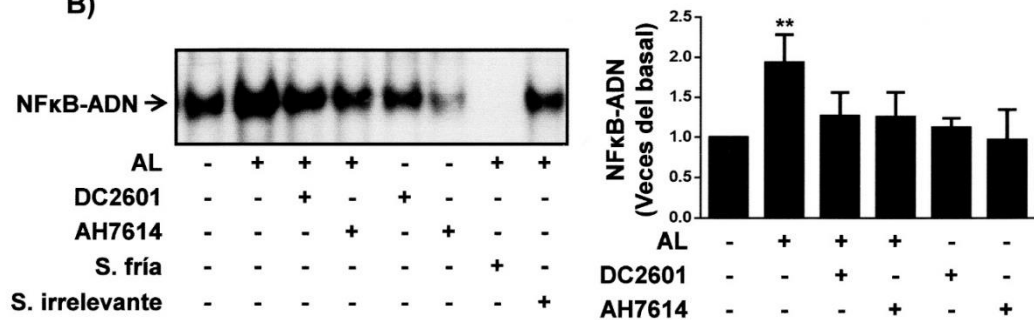
Por otro lado, se analizó la participación de FFAR1, FFAR4 y EGFR en la regulación de NFκB dependiente de AL. Con este fin, células MDA-MB-231 fueron incubadas por 1 h con 3 μM DC260126 y 20 μM AH7614, y por 30 min con 500 nM AG1478, inhibidores de FFAR1, FFAR4 y EGFR, respectivamente, y estimuladas con 90 μM de AL por 1 h. Al término del estímulo, la actividad de NFκB fue analizada por EMSA. Los resultados indicaron que la inhibición de ambos FFAR1 y FFAR4, y EGFR inhibieron la formación de complejos NFκB-ADN dependiente de AL (Fig. 10B y 10C). En conjunto, estos resultados indicaron que el AL promovió activación de NFκB en células MDA-MB-231 a través de una vía que incluye ambos FFAR1/FFAR4, así como actividad de EGFR y PLD.

**Figura 10**

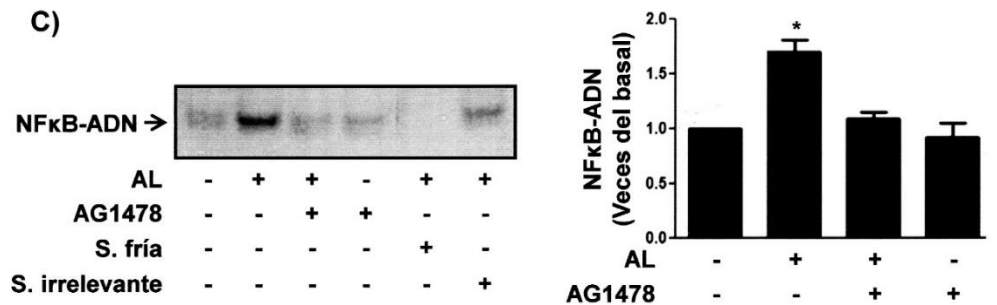
**A)**



**B)**



**C)**



**Figura 10. AL induce actividad de NFκB a través de PLD1/PLD2, FFAR1/FFAR4 y EGFR.** Porcentaje de formación de complejos NFκB-ADN en células MDA-MB-231 incubadas previamente ya sea con BtOH, VU0155069 o CAY10594 (Panel A), con DC260126 o AH7614 (Panel B), o con AG1478 (Panel C), y posteriormente estimuladas con AL por 1 h. La detección del complejo NFκB-ADN se realizó mediante EMSA. La sonda fría (oligonucleótido sin marcar con [γ-<sup>32</sup>P] ATP) y sonda irrelevante (oligonucleótido no específico para unión a NFκB) se utilizaron como competidores específico y no específico, respectivamente, y representan controles de especificidad de la sonda de ADN utilizada para la proteína NFκB. Las gráficas representan el análisis densitométrico de niveles de formación del complejo NFκB-ADN. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## **El AL induce formación de esferoides celulares a través de una vía dependiente de PLD**

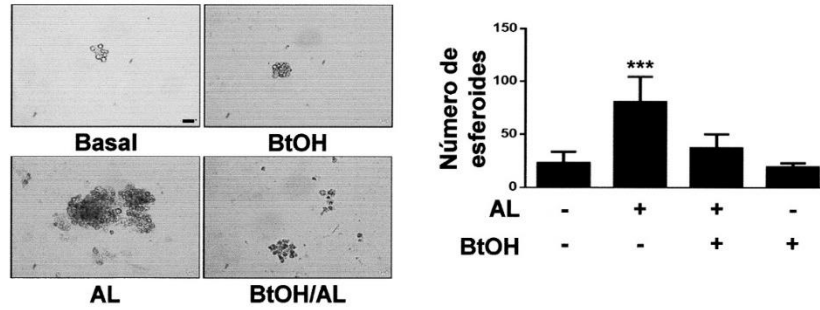
Los sistemas de cultivo celular tridimensional (3D) asemejan y reproducen de mejor forma las condiciones *in vivo* [80]; Debido a esto, se plateó estudiar el efecto del AL sobre células de cáncer de mama en un crecimiento 3D y la participación de PLD. Inicialmente, se determinó si la estimulación de células MDA-MB-231 con 90  $\mu\text{M}$  de AL induce formación de esferoides celulares en placas de baja adherencia. Como se ilustra en la Fig. 8A, el estímulo con AL indujo un incremento en el número de esferoides en las células MDA-MB-231; por el contrario, la incubación con BtOH lo inhibió (Fig. 11A).

Con la finalidad de mimetizar un microambiente similar al del tumor, se determinó el efecto del AL en la formación de esferoides en matrices que simulan las condiciones *in vivo*. Con este fin, se realizaron ensayos de formación de esferoides celulares en matrices de matrigel y colágeno tipo I. Para ello, las células MDA-MB-231 fueron ayunadas y sembradas sobre matrigel o colágeno I. Posteriormente, las células fueron estimuladas con AL por 15 días. Al finalizar el estímulo, el número y tamaño de los esferoides fue obtenido. Los resultados demostraron que el AL promovió un incremento en el número y área relativa de esferoides celulares MDA-MB-231 en cultivos 3D sobre matrices de matrigel y colágeno tipo I, respectivamente. Un control positivo con 5% de SFB fue incluido (Fig. 11B y 12A).

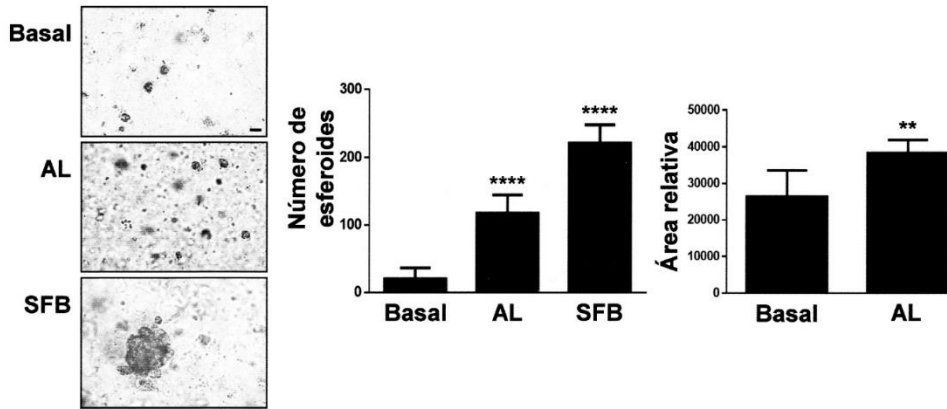
Por otro lado, se analizó si la formación de esferoides celulares inducida por AL requiere actividad de PLD. Para ello, ensayos de formación de esferoides celulares en matrigel y colágeno tipo I fueron realizados con células MDA-MB-231 incubadas con 0.3% BtOH y/o estimuladas con 90  $\mu\text{M}$  de AL por 15 días. Los resultados indicaron que la inhibición de PLD disminuyó de manera significativa el número y área relativa de esferoides celulares inducido por AL (Fig. 11C y 12B). En conclusión, AL promueve un incremento en el número y tamaño de esferoides celulares MDA-MB-231 en cultivos 3D a través de un mecanismo que requiere actividad de PLD.

**Figura 11**

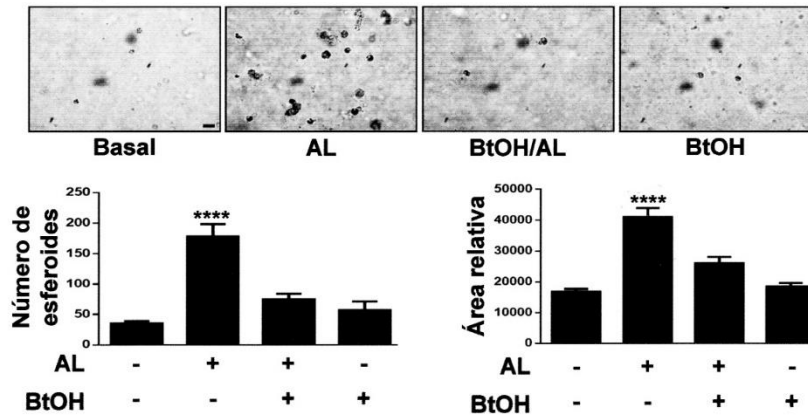
**A) Baja adherencia**



**B) Matrigel**



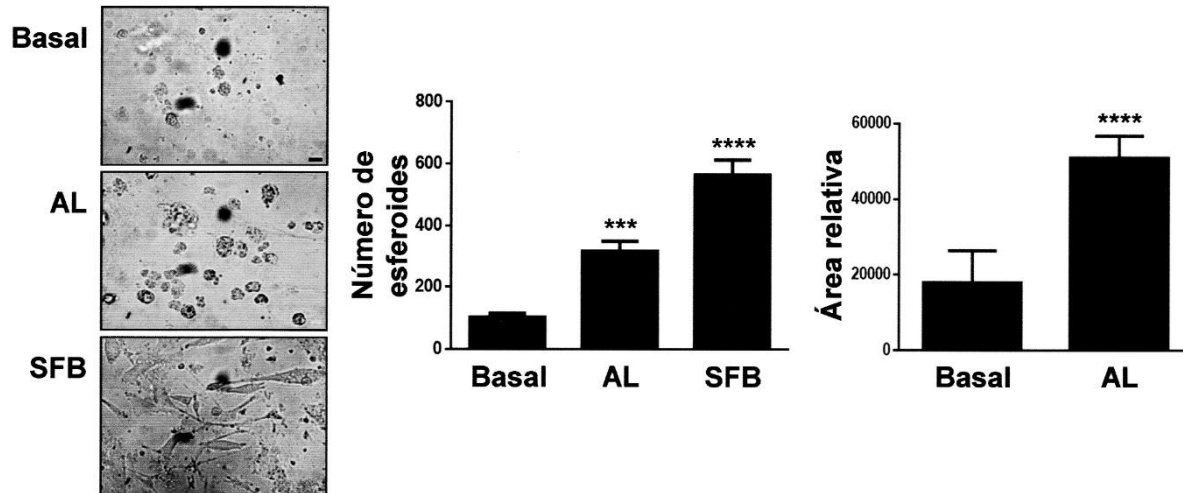
**C) Matrigel**



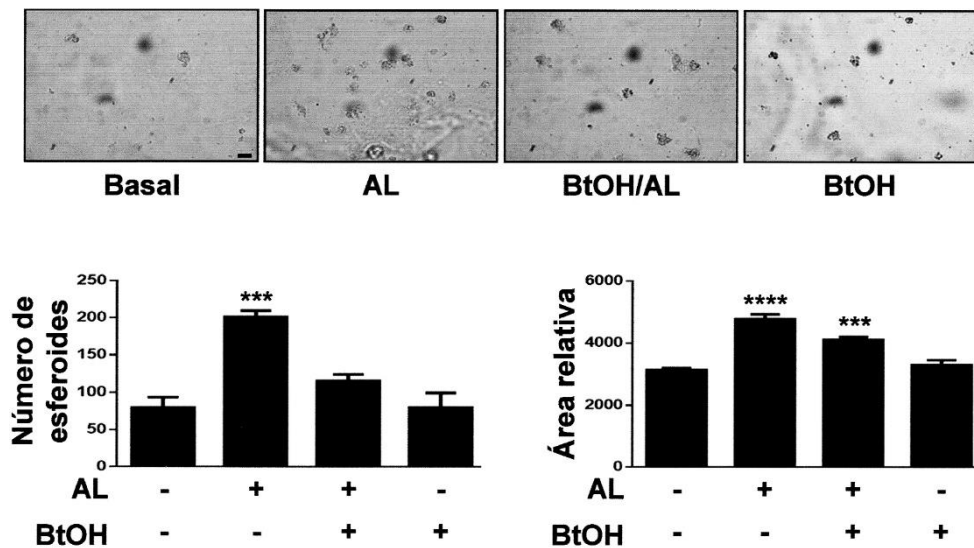
**Figura 11. AL promueve un incremento en el número y tamaño de esferoides celulares a través de una vía dependiente de PLD.** Panel A. Cultivos de esferoides de células MDA-MB-231 incubadas con AL y/o BtOH en placas de baja adherencia por 5 días. La gráfica representa el número de esferoides estimado mediante el análisis de las fotografías en el programa ImageJ (NIH, USA). Panel B y C. Cultivos de esferoides de células MDA-MB-231 incubadas con AL y/o BtOH por 15 días en matriz de matrigel. Las gráficas representan la estimación del número y área relativa de esferoides mediante el análisis de las fotografías en el programa ImageJ (NIH, USA). Un control positivo fue incluido (SFB). Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes para ensayos de formación de esferoides en placas de baja adherencia y en matrigel. Barra de escala = 300  $\mu$ m. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

**Figura 12**

**A) Colágeno tipo I**



**B) Colágeno tipo I**



**Figura 12. AL promueve un incremento en el número y tamaño de esferoides celulares en matriz de colágeno tipo I a través de una vía dependiente de PLD.** Panel A. Cultivos de esferoides de células MDA-MB-231 incubadas con AL o con SFB (control positivo) por 15 días en matriz de colágeno tipo I. Panel B. Cultivos de esferoides de células MDA-MB-231 incubadas con AL y/o BtOH por 15 días en matriz de colágeno tipo I. Las gráficas en Panel A y B representan la estimación del número y área relativa de esferoides mediante el análisis de las fotografías en el programa ImageJ (NIH, USA). Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes. Barra de escala = 300  $\mu$ m. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

## **Efecto del AL en células de cáncer de mama MCF-7**

Para determinar si el efecto del AL sobre células de cáncer de mama se restringe únicamente a la línea celular MDA-MB-231 o podría ser un fenómeno desencadenado de manera similar en otra línea celular de cáncer de mama, se realizaron ensayos de migración por cierre de herida en la línea celular MCF-7 estimuladas con 90  $\mu\text{M}$  de AL por diferentes tiempos. Los resultados mostraron que el AL indujo migración de manera significativa a las 72 h de tratamiento (Fig. 13A). Asimismo, se evaluó el papel de PLD en la migración inducida por AL. Para ello, células MCF-7 fueron incubadas previamente con 0.3% BtOH y estimuladas con 90  $\mu\text{M}$  de AL por 72 h. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con BtOH inhibió la migración inducida por AL en células MCF-7 (Fig. 13B). En contraste, cuando se analizó la actividad de PLD, el estímulo con AL en células MCF-7 no indujo incremento en la actividad de PLD para los tiempos indicados (Fig. 13C).

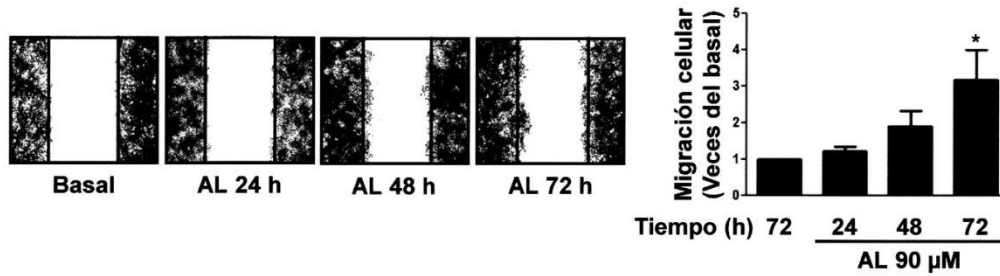
Por otro lado, se evaluó si NF $\kappa$ B es activado por AL en células MCF-7. Para ello, células MCF-7 fueron estimuladas con 90  $\mu\text{M}$  de AL por diferentes tiempos y la formación de complejos ADN-NF $\kappa$ B fue evaluado mediante EMSA. Los resultados muestran que el estímulo con AL en células MCF-7 indujo la formación de complejos ADN-NF $\kappa$ B de manera dependiente del tiempo, representando un incremento significativo a los 15 y 30 min de estímulo con AL (Fig. 13D).

Por último, se analizó el efecto del AL sobre el crecimiento de esferoides celulares MCF-7. Para cumplir con este objetivo, ensayos de formación de esferoides en placas de baja adherencia y en matriz de matrigel fueron realizados con células MCF-7 estimuladas con 90  $\mu\text{M}$  de AL. Los resultados mostraron que el estímulo con AL en células MCF-7 promovió un incremento en el número de esferoides en cultivos celulares 3D en placas de baja adherencia (Fig. 14A), así como en el número y área relativa de esferoides en cultivos celulares 3D sobre matrigel (Fig. 14B). En conclusión, el AL induce migración dependiente de PLD, activación de NF $\kappa$ B e incremento del número y tamaño de esferoides en cultivos 3D en células de cáncer de mama MCF-7.

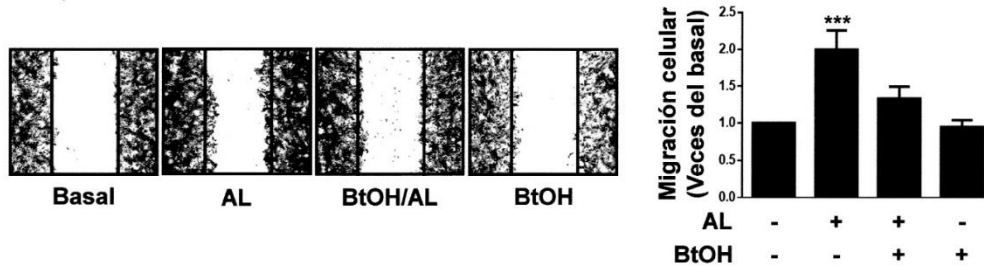


**Figura 13**

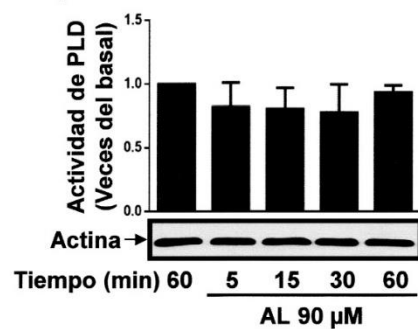
**A) Células MCF-7**



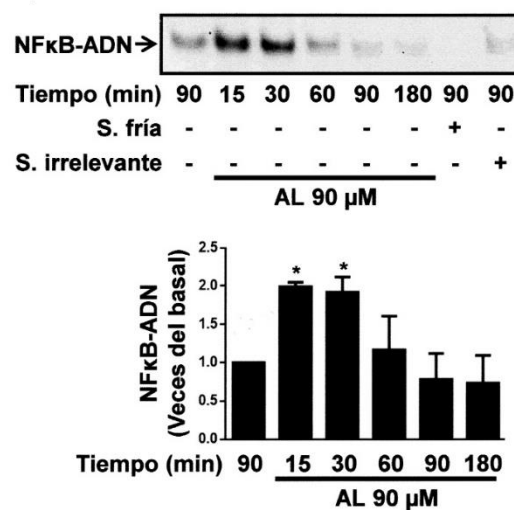
**B)**



**C)**



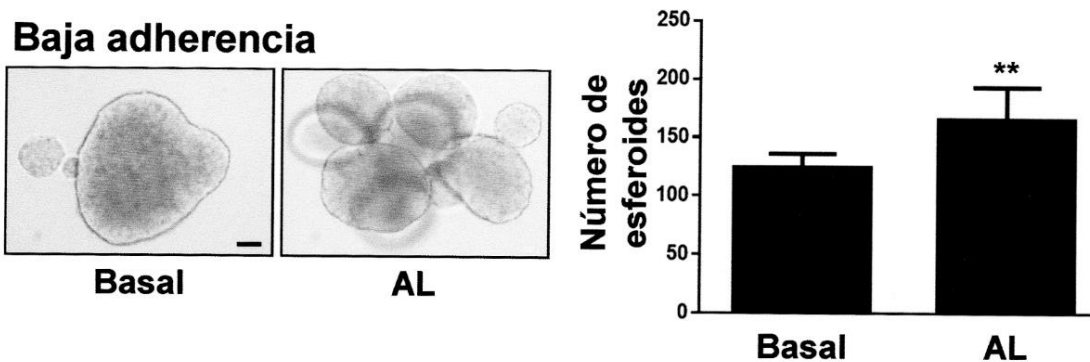
**D)**



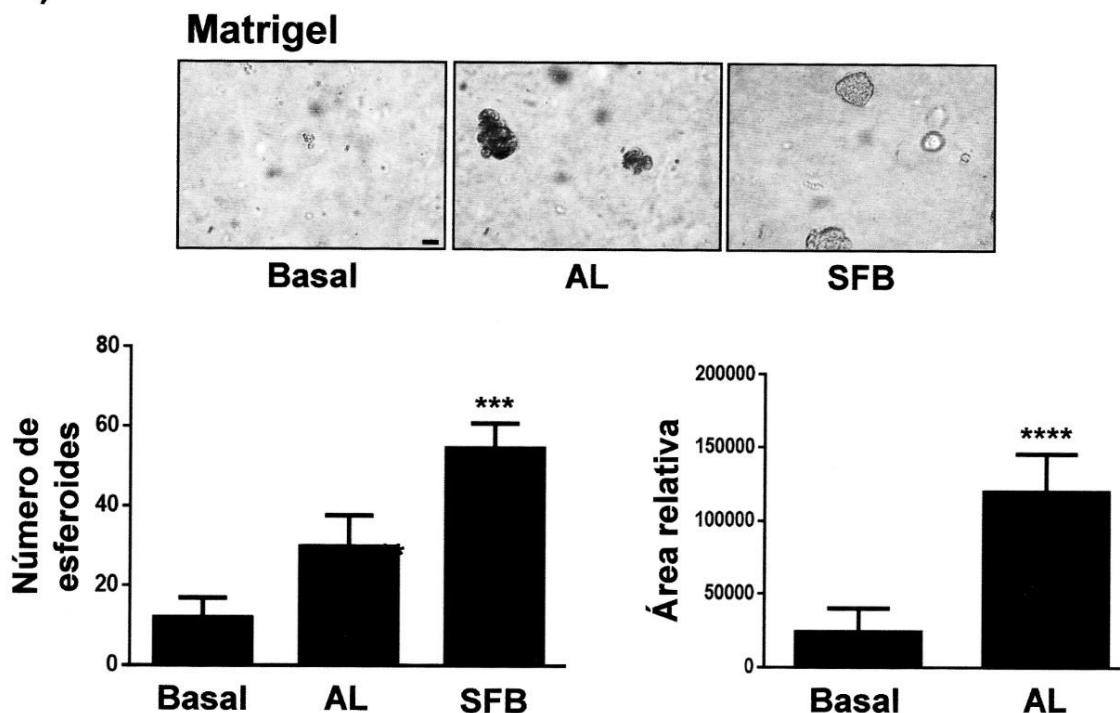
**Figura 13. AL induce migración celular y actividad de NFκB en células de cáncer de mama MCF-7.** Migración de células MCF-7 estimuladas con AL por diferentes tiempos (Panel A) o incubadas previamente con BtOH y estimuladas con AL por 72 h (Panel B). Las gráficas representan el índice de migración celular hacia el área abierta de la rayadura. Panel C. La gráfica representa la actividad de PLD en células MCF-7 estimuladas con AL por diferentes tiempos. Un Western blot con un Ab anti-actina fue incluido como control de carga para el ensayo de actividad de PLD. Panel D. Porcentaje de formación de complejos NFκB-ADN en células MCF-7 estimuladas con AL por diferentes tiempos. La detección del complejo NFκB-ADN se realizó mediante EMSA. Las gráficas representan el análisis densitométrico de niveles de formación del complejo NFκB-ADN. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes para ensayos de cierre de herida por rayadura, actividad de PLD y EMSA. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

## Figura 14

### A) MCF-7



### B) MCF-7



**Figura 14. AL promueve un incremento en el número y tamaño de esferoides celulares MCF-7.** Panel A. Cultivos de esferoides de células MCF-7 incubadas con AL en placas de baja adherencia por 5 días. La gráfica representa el número de esferoides estimado mediante el análisis de las fotografías en el programa ImageJ (NIH, USA). Panel B. Cultivos de esferoides de células MCF-7 incubadas con AL por 15 días en matriz de matrigel. Las gráficas representan la estimación del número y área relativa de esferoides mediante el análisis de las fotografías en el programa ImageJ (NIH, USA). Un control positivo fue incluido (SFB). Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes para ensayos de formación de esferoides en placas de baja adherencia y en matrigel. Barra de escala = 300  $\mu$ m. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con células no estimuladas. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Figura 15

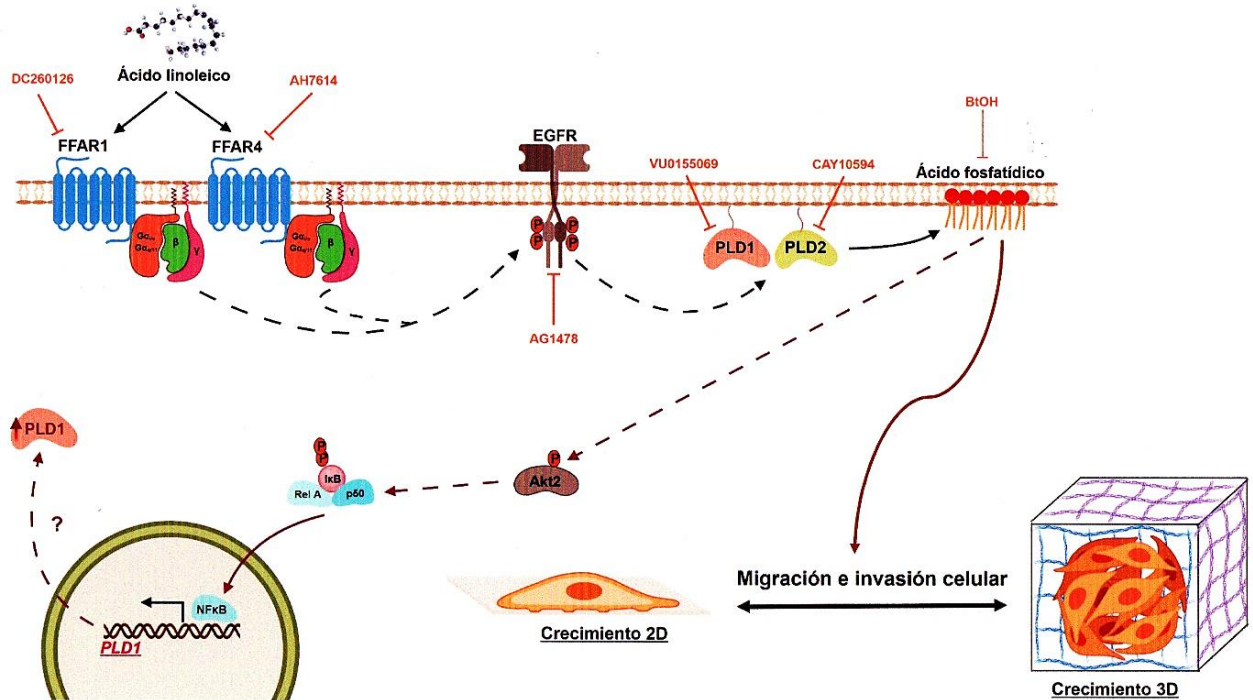


Figura 15. Papel de PLD en la migración e invasión inducida por AL en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

## DISCUSIÓN

En los últimos años se ha establecido una fuerte correlación entre una dieta occidental, caracterizada por una alta ingesta de AGs y el riesgo de desarrollar cáncer de mama [81,82]. Particularmente, el AL es un PUFA  $\omega$ -6 presente en aceites vegetales, el cual regula una variedad de procesos biológicos incluyendo migración e invasión en células de cáncer de mama, así como crecimiento del tumor y metástasis en ratones desnudos [33–35,37,83]. Diversos mecanismos moleculares han sido propuestos para la participación de AGLs en la tumorigénesis [24,84], no obstante, todavía no han sido bien detallados.

La metástasis es un proceso secuencial que involucra periódicamente una pérdida y ganancia de ciertas funciones en las células cancerosas, donde la adquisición de un fenotipo migratorio e invasivo es esencial. PLD desempeña un papel trascendental en cáncer, debido a que una expresión y actividad elevada de la

enzima ha sido reportada en diversos cánceres humanos, incluyendo cáncer gástrico, colorrectal, renal, de estómago, y mamario [14,85]. En este aspecto, diversos promotores tumorales como PDGF, IL-1 $\beta$ , EGF y PDB han sido descritos que incrementan la expresión y actividad de PLD en células de cáncer de mama [66,71]. Bajo este contexto, los resultados mostrados en el presente estudio demostraron que AL induce activación de PLD en células de cáncer de mama MDA-MB-231. No obstante, la cinética de activación de PLD fue de manera transitoria y oscilatoria para los tiempos evaluados. Acorde con lo anterior, en células de carcinoma adrenocortical humanas NCI H295R, el estímulo con angiotensina II induce activación transitoria de PLD, del mismo modo, EGF induce activación de PLD2 con incrementos oscilatorios de actividad en células COS-7 que expresan PLD2 [86,87]. En razón de lo expuesto, estos hallazgos evidencian que diferentes ligandos extracelulares inducen activación de PLD con cinéticas específicas de actividad, en función de la naturaleza de la señal y el contexto celular. En adición, en un modelo de células de hepatocarcinoma HepG2, el estímulo con ácido oleico (AO), un MUFA común en la dieta occidental, promueve activación de PLD, así como proliferación celular [88].

A nivel estructural, uno de los principales cambios presentes en células de tumores mamarios con respecto a tejido mamario normal, es un incremento en la concentración de fosfatidilcolina [89], un fosfolípido constituyente de las membranas celulares y principal sustrato de PLD para generar AF. En este sentido, el AF es un fosfolípido aniónico cuya carga eléctrica genera pliegues en la membrana plasmática de manera polarizada, regulando el rearrreglo del citoesqueleto de actina y promoviendo la formación de protrusiones membranales en forma de lamelipodias, así como generando sitios de acoplamiento para proteínas efectoras que desempeñan papeles importantes en la transmisión y amplificación de señales intracelulares. De esta manera, en cáncer, el AF es asociado a diferentes procesos celulares, incluyendo sobrevivencia y proliferación celular, resistencia a fármacos antitumorales (rapamicina y doxorubicina), migración e invasión [14,90–93]. Diversos estudios han evaluado el papel del AF en procesos celulares tumorales mediante la inhibición de la formación de este segundo mensajero, siendo los

alcoholes primarios como el BtOH ampliamente usados, puesto que actúan como sustratos de gran afinidad para PLD en la reacción de transfosfatidilación, generando fosfatidilalcoholes inertes en vez de AF [73,94]. En ese mismo orden de ideas, en el presente trabajo se demostró que el AF regula procesos de migración e invasión de células MDA-MB-231 inducidos por AL. Acorde con este resultado, el AF ha sido descrito que regula la actividad de la GTPasa Rac1 y la formación de lamelipodias en la línea celular de carcinoma de ovario OVCAR-3 durante la migración celular. Asimismo, regula migración inducida por IL-8 en neutrófilos humanos; además promueve secreción de MMP-2 y -9 e invasión en células de cáncer de mama SK-BR3 [66,87,95].

La migración e invasión de células tumorales de mama hacia el tejido adyacente son procesos dependientes de moléculas que regulan los contactos focales hacia componentes de la MEC. Así pues, PLD desempeña un papel muy importante en estos procesos, ya que regula (frecuentemente) la dinámica del citoesqueleto de actina a diferentes niveles, por ejemplo, se une directamente a filamentos de actina, regula actividad de GTPasas de la familia Rho, así como modula el tráfico vesicular de proteínas asociadas al citoesqueleto de actina durante la polarización celular. Sin embargo, en cáncer se ha descrito una expresión diferencial y funciones específicas de PLD1 y PLD2, generalmente asociadas a proporcionar un fenotipo prometastásico. Particularmente, una activación selectiva de PLD1 inducida por el éster de forbol PMA regula adhesión y migración en neutrófilos [96], mientras que un incremento en la expresión de PLD1 promueve secreción de MMP-2 y -9, así como invasión de células de cáncer colorrectal, de glioma y células de cáncer de mama, respectivamente [66,71,97]. Por el contrario, una activación selectiva de PLD2 inducida por IL-8 regula migración de leucocitos humanos mediante una actividad bifásica, es decir, actuando como un GEF para la activación de Rac2 y presentando actividad lipasa para generar AF [87]. Además, la sobreexpresión de PLD2 promueve invasión de células de linfoma EL4, así como invasión y metástasis de células de cáncer de mama xenotransplantadas en ratones SCID [87,98]. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone que la actividad de ambas isoformas de PLD (PLD1 y PLD2) convergen en la señalización desencadenada por

AL para promover migración de células MDA-MB-231. Sin embargo, resulta interesante dilucidar un papel específico para PLD2 actuando como un GEF en la dinámica del citoesqueleto de actina.

Dado que nuestros resultados mostraron un bloqueo total de la invasión en la línea celular MDA-MB-231 con la inhibición de PLD1, proponemos que, en esta línea celular el AL promueve una regulación transcripcional positiva de PLD1 y, en consecuencia, un incremento en la expresión de PLD1 ejerce papeles específicos requeridos en el proceso de invasión celular. Sustentando esta hipótesis, PLD1 frecuentemente es sobreexpresado en tumores mamarios de tipo basal, asociados con un pobre pronóstico. Del mismo modo, en células de cáncer de mama SK-BR3, el estímulo con EGF o PDGF inducen expresión selectiva de PLD1, y posteriormente, secreción de MMP-2 y -9 e invasión celular [66,99]. Tomando en conjunto estos resultados, proponemos que diferentes ligandos extracelulares que actúan como agentes mitogénicos, regulan el proceso de invasión en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 a través de la expresión o activación específica de isoformas de PLD.

Por otro lado, una expresión y señalización desregulada de GPCRs han sido postulados como marcadores de cáncer [100]. Concretamente, FFAR1 y FFAR4 son receptores para AGs no esterificados de cadena media y larga que regulan mecanismos homeostáticos fisiológicos como metabolismo e inflamación. Sin embargo, también regulan procesos patológicos en cáncer, siendo ambos receptores expresados en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, sugiriendo que una elevada expresión de estos receptores confiere mayor susceptibilidad a la progresión tumoral en pacientes con cáncer de mama [30], [48,49,101]. Específicamente, FFAR1 promueve fosforilación de ERK1/2 y proliferación en células de cáncer de mama MCF-7 [49,101], mientras que FFAR4 induce migración y angiogénesis en células de carcinoma colorrectal, así como migración en células MDA-MB-231 [35,102]. Los presentes hallazgos demostraron que ambos receptores FFAR1 y FFAR4 participan conjuntamente en los procesos de migración e invasión inducidos por AL en células MDA-MB-231, siendo el proceso de invasión totalmente dependiente de FFAR1. Una posible explicación para este

fenómeno, es que los niveles de expresión de los transcritos y de la proteína de FFAR1 son mayores con respecto a FFAR4 en células MCF-7 y MDA-MB-231 [103], resultando en una mayor respuesta de FFAR1 al estímulo con AL. Por otra parte, se ha reportado que la señalización de FFAR1 y FFAR4 depende de proteínas  $G_{i/o}$  y  $G_{q/11}$ . Sin embargo, no se ha estudiado la participación de proteínas  $G_{12/13}$ . Los lípidos bioactivos como LPA y esfingosina 1-P (S1P) activan GPCRs que se encuentran acoplados a proteínas  $G_{12/13}$  para promover migración, invasión y metástasis [104–107]. Con base en estos antecedentes, hipotetizamos que las proteínas  $G_{12/13}$  pueden ser proteínas efectoras dentro de la señalización desencadenada por el AL hacia el FFAR1, donde dicha activación de proteínas  $G_{12/13}$  regulen mecanismos moleculares específicos del proceso de invasión celular.

En un contexto de señalización intracelular, los GPCRs pueden inducir la activación de PLD a través de ejes de señalización que implican subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  de proteínas  $G_{i/o}/G_{q/11}$  y subsecuente activación de  $PLC\beta$ - $PKC\alpha$ . Por otro lado,  $G_{12/13}$  puede activar PLD a través de ejes de señalización de proteínas Pyk2-RhoA o  $PI3K\gamma$ -RhoA/ARF [108]. En relación con lo anterior, la activación de PLD inducida por AL en células MDA-MB-231 requiere conjuntamente participación de ambos receptores FFAR1 y FFAR4, puesto que la inhibición específica de cada receptor no fue suficiente para bloquear la actividad de PLD. Sin embargo, resulta interesante determinar si en tiempos prolongados de estímulo con AL (no analizados en el presente estudio), los FFARs siguen promoviendo la activación de PLD. Con respecto a lo anterior, se ha determinado que una exposición prolongada de agonistas de GPCRs inducen una fosforilación acelerada del receptor y desacople de proteínas G, promoviendo internalización del receptor hacia una ruta de degradación proteolítica, o bien, hacia reciclamiento y resensibilización del receptor en membrana plasmática [109,110]. En ese mismo orden de ideas, se han descrito mecanismos de regulación del receptor mediante fosforilación homóloga y fosforilación heteróloga para FFARs. La fosforilación homóloga es llevada a cabo por GRKs, dicha vía generalmente lleva a degradación del receptor, mientras que una fosforilación heteróloga es ejecutada por PKC, un modulador de la actividad de PLD, y este mecanismo es asociado a reciclamiento del receptor a membrana plasmática.

Dado que proteínas como ARF6, PLD y el lípido AF regulan internalización y tráfico vesicular del receptor [108,111], se sugiere que la activación de PLD inducida por AL podría promover reciclamiento a membrana plasmática y resensibilización de FFAR1 y FFAR4 como un mecanismo de retroalimentación positiva. Este reciclamiento permite, de esta manera, perdurar la señalización de receptores y posterior activación de PLD para promover procesos de migración e invasión en células MDA-MB-231. En acorde con esta hipótesis, se ha reportado que, en células renales embrionarias 293 (HEK293) estimuladas con PMA, un activador de PKC, se incrementan los niveles de fosforilación heteróloga y reciclamiento de FFAR4 a membrana plasmática [112]; lo mismo sucede, cuando son estimuladas con AO [113], siendo ambos agentes mitogénicos inductores de la actividad de PLD [71,88]. Con base en estos resultados, se propone que AL es capaz de inducir activación de vías de señalización que regulan migración e invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 a través de los receptores FFAR1 y/o FFAR4.

Una expresión elevada de PLD y EGFR contribuyen a la transformación celular y progresión tumoral en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama [114]. Adicional al mecanismo de activación clásico por ligandos de la familia de EGF, el EGFR es un receptor que actúa como sensor para cambios de fluidez en la membrana plasmática o moléculas anfifílicas [115]. En un ambiente fisiológico, los AGLs son moléculas anfifílicas que son transportados en torrente sanguíneo unidos a albumina, adquiriendo un carácter molecular polar. Con respecto a lo anterior, se ha descrito que diferentes agonistas de GPCRs son capaces de promover transactivación del EGFR en diferentes modelos celulares. Específicamente, se ha descrito que los AGs de cadena larga, tales como los PUFAs  $\omega$ -6 inducen fosforilación del EGFR a través del mecanismo de transactivación. En este sentido, se ha descrito la participación de proteínas  $G_{i/o}/G_{q/11}$ , miembros de la familia de la cinasa Src, proteínas de la familia ADAMs y liberación de ligandos de tipo EGF anclados en membrana plasmática [101,115–118]. De acuerdo con Serna-Marquez *et al.*, los presentes resultados indican que la migración y la invasión de células MDA-MB-31 inducidos por AL requiere actividad del EGFR. Adicionalmente, nuestros resultados demuestran que AL promueve fosforilación de residuos de tirosina del



EGFR, mientras que la activación de PLD inducida por AL en células MDA-MB-231 requiere de la actividad de EGFR. Tomando estos resultados en conjunto, se propone que el AL induce fosforilación del EGFR a través de un mecanismo de transactivación que implica la participación de ambos receptores FFAR1/4, proteínas  $G_{i/o}$  y  $G_{q/11}$ , una posterior activación de miembros de la familia de la cinasa Src, que consecuentemente catalizan la fosforilación directa de Tyr-845 o Tyr-1101 en la región citoplasmática del EGFR, o bien, inducen la liberación de ligandos específicos del receptor presentes en la membrana plasmática. De acuerdo con lo anterior, se ha reportado previamente que el estímulo con AL induce la fosforilación de la proteína Src en un espacio temporal similar a los resultados de activación de proteínas EGFR y PLD obtenidos en el presente trabajo [34].

El EGFR puede activar a PLD a través de proteínas como PKC o GTPasas de la familia de Rho y de la familia de Arf [63]. Sin embargo, en cáncer se han descrito mecanismos divergentes de activación para la isoforma PLD2. Un mecanismo implica activación de la isoforma PLD2 por interacción directa con EGFR, o bien, formando complejos con proteínas como JAK3-Fes, con Src, y con la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B). Asimismo, EGFR puede regular a PLD2 mediante fosforilación en el residuo Tyr-296, que promueve inhibición de la proteína, y mediante JAK3 en el residuo Tyr-415, que promueve su activación [91,119]. Con los resultados obtenidos resulta elusivo determinar si el AL promueve la activación de PLD a través de una interacción directa con el EGFR, no obstante, no se descarta participación de JAK3 y PTP1B. En contexto con lo anterior, ha sido descrito que la actividad de PLD2 es baja en células no metastásicas MCF-7, esto debido a que se encuentran niveles basales de la fosforilación de la enzima en su residuo Tyr-296 mediante el EGFR [119], esto sugiere que en líneas celulares de cáncer de mama altamente invasivas, tales como las células MDA-MB-231, PTP1B podría ejercer actividad fosfatasa sobre el residuo Tyr-296 de PLD2 y así modular positivamente su actividad. En relación a PLD1, se propone que podría ser activado río abajo de la señalización de PLD2, debido a que su localización subcelular reside en compartimentos intracelulares y requiere ser reclutada a membrana plasmática para su activación, siendo el AF formado en membrana plasmática, un factor

desencadenante para su reclutamiento [120,121]. Así como previamente se ha reportado que PLD1 puede ser fosforilada en residuos de tirosina, pero no conducen a cambios en su actividad enzimática [122,123].

La actividad de NFκB es esencial para la transformación oncogénica y progresión tumoral desencadenada por la vía de señalización PI3K-Akt. Específicamente, la activación de esta forma de señalización se encuentra incrementada en tumores más agresivos como aquellos que presentan un subtipo molecular de cáncer de mama triple negativo (TNBC) o positivos a la expresión de HER2. Akt es fosforilado en los residuos Thr-308 y Ser-473 para adquirir su conformación activa, siendo un efector directo el complejo Iκk. Akt fosforila la subunidad catalítica Iκkα en el residuo Thr-23, permitiendo que subunidades catalíticas Iκkα e Iκkβ ejerzan actividad enzimática para fosforilar el residuo Ser-534 de la subunidad p65 de NFκB, y promover su actividad para la modulación de transcripción de genes blanco. Este eje de señalización es trascendental para regular procesos celulares en cáncer de mama como resistencia a fármacos, inhibición de apoptosis, inducción de proliferación, angiogénesis e invasión [124–127]. Previamente, se ha descrito que el AL induce la activación de Akt2 y NFκB en células MDA-MB-231 [35]. No obstante, el papel de PLD en la activación de este eje de señalización no ha sido descrito. Con respecto a los presentes resultados, queda demostrado que la fosforilación de Akt2 en células MDA-MB-231 estimuladas con AL, requiere participación de FFAR4 y actividad de ambas isoformas de PLD, mientras que la actividad de unión NFκB-ADN requiere participación de ambos FFAR1/4, actividad de EGFR y PLD2, y en menor proporción de PLD1. En relación con lo previamente planteado, la señalización desencadenada por FFAR4 en células de carcinoma colorrectal humanas induce motilidad celular y promueve angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, incrementando la expresión y secreción de VEGF, IL-8 y prostaglandina E2 [102].

Los mecanismos por los cuales PLD puede modular la activación de Akt-NFκB pueden ser dependientes del contexto celular. PLD y su producto AF, pueden promover el reclutamiento y activación a membrana plasmática de la proteína SOS, un GEF que desencadena la activación de la GTPasa Ras que, a su vez, puede

activar directamente la isoforma IA de PI3K y en consecuencia, promover activación de Akt. En este sentido, la actividad de ambas isoformas de PLD inducida por factores de crecimiento en células de cáncer de mama SK-BR3, promueven activación de la GTPasa Ras, la cual activa la vía de señalización de PI3K-Akt-NFκB, promoviendo invasión celular [66,128]. Por otra parte, el dominio PH de Akt presenta una alta afinidad por fosfatidilinositol (PI) en membrana plasmática, específicamente por PI fosforilado en las posiciones 3 y 4 del anillo de inositol, representados como fosfolípidos PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3. Bajo este contexto, el AF producido por actividad de PLD puede modular la actividad de cinasas de PI, como PI3K y PI5K, mientras que PTEN, una fosfatasa de PI e inhibidora de la vía PI3K/Akt, puede activar PLD, creando una modulación recíproca de la activación entre PLD y Akt [108,114,129,130], lo que podría explicar parcialmente, la cinética de actividad transitoria de PLD inducida por AL. Sin embargo, con los presentes resultados no se puede concretar si PLD podría ser un eje central en la modulación de la actividad total de Akt2 en el modelo celular estudiado.

Dado que el bloqueo de la actividad de PLD inhibe totalmente la fosforilación de Akt2, proponemos que PLD podría estar regulando la fosforilación de Akt2 en diferentes niveles, sin embargo, es importante dilucidar el mecanismo preciso ya que en los presentes resultados se analizó solo la fosforilación del residuo Ser-473 que es dependiente de la vía PLD-mTORC2, siendo interesante analizar si PLD podría estar regulando también la fosforilación del residuo Thr-308 en la que PLD podría ejercer un papel importante de acuerdo a los mecanismos descritos previamente. En contexto con lo anterior, ha sido descrita una interacción proteína-proteína entre PLD2 y Akt, siendo la fosforilación del residuo Ser-473 de Akt, independiente de la actividad de PI3K, proponiendo que este residuo module la selectividad de la isoforma y especificidad de la señalización de Akt, en vez de su activación enzimática [127,131].

De acuerdo a lo hipotetizado previamente, donde se propone que existe una regulación positiva de la expresión de PLD1 para regular invasión celular, nuestro modelo describe que el AL promueve actividad de unión NFκB-ADN, siendo reportado previamente que la región promotora del gen de PLD1 contiene dos

elementos de respuesta de unión específica a NFκB, mientras que la región promotora del gen de PLD2 carece de elementos de respuesta de unión a este factor nuclear; así como una expresión ectópica de NFκB incrementa los niveles de expresión de PLD1, pero no de PLD2 [66,132].

Hanahan y Weinberg describieron diversas características fenotípicas y marcadores moleculares presentes durante el desarrollo y progresión tumoral, tales como una elevada expresión de proteínas tirosina cinasa en fenotipos altamente invasivos y metastásicos [133,134]. En este sentido, existe una correlación entre una elevada expresión y actividad de PLD y una pérdida de expresión del receptor de estrógenos (RE) en células de TNBC que sobreexpresan proteínas tirosina cinasa como EGFR, Her2 y Src. Dado lo anterior, células de cáncer de mama MCF-7 que expresan el RE, presentan baja expresión y actividad de PLD con respecto a células MDA-MB-231, una línea celular de TNBC [95,114,135,136]. En relación a los presentes resultados, el AL promueve migración en células de cáncer de mama no invasivas MCF-7 por un mecanismo que implica actividad de PLD, pese a que, el AL no es capaz de promover la misma cinética temporal de activación de PLD obtenida en células MDA-MB-231. Con base en los perfiles de expresión y regulación de actividad de PLD, se propone que AL promueve en células MCF-7 un incremento en la expresión de PLD que secuencialmente estaría promoviendo mecanismos asociados a la migración celular. En acuerdo con lo anterior, diversos mecanismos podrían ser desencadenados por AL para promover expresión y activación de PLD en células MCF-7. En primera instancia, el AL promovió activación de NFκB en esta línea celular, y como se describió anteriormente, este factor de transcripción modula la transcripción del gen de PLD1 [66,132]. Por otro lado, se han descrito mecanismos de regulación postranscripcional de PLD2 en cáncer de mama, tal es el caso de las células MCF-7 que presentan una elevada expresión del miR203, un microARN (miARN) que se une directamente al transcrito de PLD2, así como una elevada expresión de la ribonucleasa PARN, descrita para reprimir traducción del mRNA de PLD2. En contraparte, la expresión de dichos reguladores postranscripcionales se encuentra reprimida en células MDA-MB-231 [137]. Otro mecanismo de regulación diferente a una modulación génica, es la fosforilación en el residuo inhibitorio Tyr-

296 de PLD2 ejercida por EGFR, el cual podría participar en la baja actividad de PLD en MCF-7 [65,119]. En relación a estos mecanismos, se demostró que el AL induce migración en células MCF-7 con una cinética diferente con respecto a las células MDA-MB-231. En acuerdo con lo anterior, en células MCF-7 la inhibición de NFκB restaura sensibilidad a tamoxifen, un antagonista del RE, mientras que una expresión ectópica de PLD2 incrementa la invasión *in vivo* de células MCF-7 xenotransplantadas en ratones SCID [87,125]. Por todo lo anterior, PLD puede proponerse como un oncogen en distintos tipos de cáncer de mama, donde una expresión elevada de cinasas de tirosina es común.

La comprensión de muchos procesos biológicos o función de diversas proteínas se ha logrado a partir de estudios de poblaciones homogéneas de células cultivadas en sustratos de plásticos o vidrios planos, bidimensionales (2D). Las células que crecen en monocapa son planas y pueden adherirse y extenderse libremente en el plano horizontal, pero no tienen soporte para extenderse en la dimensión vertical. Esta polaridad celular planar difiere de la configuración superficie-volumen obtenida en el microambiente *in vivo*, de modo que en cultivos celulares 2D la señalización desencadenada desde la superficie celular se propaga aceleradamente hacia la célula alterando la modulación de la señalización intracelular [138,139]. Respecto a esto, diversos estudios *in vivo* fallan para reproducir el perfil molecular y el fenotipo celular obtenidos en crecimiento 2D. Por otra parte, los cultivos celulares 3D simulan, con mejor precisión, el microambiente tumoral *in vivo*, desarrollan gradientes de distribución de pH, oxígeno y nutrientes, causando una estratificación celular en esferoides maduros con perfiles morfológicos y microambiente semejante al modelo *in vivo*. Esta estratificación en esferoides genera una capa externa altamente proliferativa, una capa interna con células quiescentes y un núcleo necrótico central, presentando una relación geométrica similar a procesos tumorales de micrometástasis no vascularizada *in vivo* [140–143]. Por ello, en el presente trabajo, el cultivo 3D de células MCF-7 dio como resultado la formación de esferoides compactos, mientras que células MDA-MB-231 tienden a formar agregados celulares [141]. En parte, esta diferencia puede ser debido al fenotipo morfológico y perfil molecular que expresa cada línea celular respecto a proteínas asociadas a las

uniones celulares. Las células MCF-7 conservan ciertas características epiteliales, tales como la expresión de proteínas E-cadherina y  $\beta$ -catenina, que le permite crecer en un cultivo 3D mediante uniones célula-célula. Mientras que células MDA-MB-231 expresan bajos niveles de  $\beta$ -catenina y, particularmente, expresan la isoforma 11-Cadherina, una proteína asociada a conferir un fenotipo invasivo [140,144–146]. Adicionalmente, las células MDA-MB-231 expresan niveles altos de receptores a MEC, específicamente, expresan la subunidad  $\beta$ 1 de integrina, asociada en el contexto de cáncer para formar heterodímeros de integrina  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 y  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 que reconocen colágeno tipo I y IV [147–150]. Asimismo, expresan receptores con dominio de discoidina (DDRs), particularmente DDR2, una isoforma expresada en células del estroma y carcinomas invasivos que reconoce colágeno tipo I [151,152]. En conjunto, este perfil de expresión de proteínas asociadas a las uniones celulares permite ensamblar uniones célula-célula débiles y así poder desprenderse del esferoide inicial, mientras que las uniones hacia la MEC son dinámicas y le permiten fácilmente degradar y migrar a través de esta estructura para formar a distancia otros esferoides tumorales. En resumen, el AL promueve, en mayor medida, el incremento en el tamaño de los esferoides en células MCF-7 con respecto a células MDA-MB-231, sugiriendo que el AL regula principalmente proliferación en esta línea celular, así como incrementando la capacidad de división celular en la región proliferativa del esferoide tumoral, similar a procesos de expansión clonal de un tumor primario durante el desarrollo tumoral *in vivo*. Por otra parte, el AL promueve el crecimiento de esferoides tumorales en células MDA-MB-231, teniendo mayor impacto en fomentar un incremento en el número de esferoides con respecto a células MCF-7. Esto sugiere que, el AL regula proteínas asociadas a la invasión celular, como MMPs y receptores a componentes de la MEC, siendo integrinas y DDRs candidatos centrales. En conjunto, se propone que el efecto del AL en el crecimiento de esferoides tumorales mamarios en cultivos 3D, asemeja procesos de progresión tumoral *in vivo*, tales como el crecimiento metastásico avascular tumoral.

En relación a la participación de PLD en el crecimiento de esferoides celulares MDA-MB-231 inducido por el AL, esta enzima ha sido asociada a la regulación de proteínas que promueven invasión celular, razón por la cual, esta enzima podría estar

modulando la expresión y función de receptores a MEC como integrina  $\beta 1$  o DDRs. Dicha expresión de receptores podría ser modulada en función de la matriz en la cual son cultivadas las células de cáncer de mama; en este caso, las matrices fueron compuestas por colágeno tipo IV o colágeno tipo I, proteínas expresadas en tejido mamario, principalmente en membrana basal y en estroma, respectivamente. En acuerdo con esta propuesta, PLD regula invasión, crecimiento del tumor y metástasis en un modelo xenográfico de cáncer de mama humano [67]. Sin embargo, una asociación entre FFARs, PLD y proteínas asociadas a uniones celulares en un contexto tumoral *in vivo* no ha sido explorado.

En resumen, el presente trabajo establece que, la estimulación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 con AL induce la activación de FFAR1/FFAR4, los cuales promueven transactivación de EGFR y, en consecuencia, señalización de EGFR, promoviendo la activación de PLD1/PLD2 y subsecuente producción de AF. AF induce activación de vías de señalización que regulan migración e invasión de células de cáncer de mama en cultivos celulares 2D y promueve el crecimiento de esferoides tumorales en cultivos 3D (Fig. 15). Nuestros resultados definen una nueva ruta de señalización mediada por AL en células de cáncer de mama.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, "Global cancer statistics," *CA. Cancer J. Clin.*, 2011.
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, 2018.
- [3] E. de la Vara-Salazar, L. Suárez-López, A. Ángeles-Llerenas, G. Torres-Mejía, and E. Lazcano-Ponce, "Tendencias de la mortalidad por cáncer de mama en México, 1980-2009," *Salud Publica Mex.*, vol. 53, no. 5, pp. 385–393, 2011.
- [4] L. S. Palacio-Mejía, E. Lazcano-Ponce, B. Allen-Leigh, and M. Hernández-Avila, "[Regional differences in breast and cervical cancer mortality in Mexico between 1979-2006].," *Salud pública de México*, 2009.
- [5] E. Yused and A. Esparza, "Cáncer de la Mujer," *Secr. Salud*, 2015.
- [6] A. M. Salinas-Martínez, A. Juárez-Ruiz, Á. Mathiew-Quirós, F. J. G. De La Garza, S. L. Adriana, and C. Escobar-Moreno, "Cáncer de mama en México: Tendencia en los Últimos 10 años de la incidencia y edad al diagnóstico," *Rev.*

- Investig. Clin.*, vol. 66, no. 3, pp. 210–217, 2014.
- [7] N. Reynoso-noverón and J. A. Torres-domínguez, “Epidemiología del cáncer en México : carga global y proyecciones 2000-2020,” *Rev Lat. Med Cond*, vol. 8, pp. 9–15, 2018.
- [8] INEGI, “ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER,” p. 13, 2018.
- [9] K. Polyak and R. Kalluri, “The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer.,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010.
- [10] M. B. R. Hansen, “Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones,” *Endocr Relat Cancer*, vol. 7, no. 2, pp. 95–113, 2000.
- [11] F. Hassiotou and D. Geddes, “Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge,” *Clin. Anat.*, vol. 26, no. 1, pp. 29–48, 2013.
- [12] K. McPherson, “ABC of breast diseases: Breast cancer---epidemiology, risk factors, and genetics,” *BMJ*, 2000.
- [13] A. F. Chambers, A. C. Groom, and I. C. MacDonald, “Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites,” *Nature Reviews Cancer*. 2002.
- [14] J. Gomez-Cambronero, “Phosphatidic acid, phospholipase D and tumorigenesis,” *Adv. Biol. Regul.*, vol. 54, no. 1, pp. 197–206, 2014.
- [15] ACS, “Breast cancer,” *World Heal. Organ.*, 2018.
- [16] F. Gertler and J. Condeelis, “Metastasis: Tumor cells becoming MENAcing,” *Trends in Cell Biology*. 2011.
- [17] P. Buell, “Changing incidence of breast cancer in japanese-american women,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 51, no. 5, pp. 1479–1483, 1973.
- [18] N. Khan, F. Afaq, and H. Mukhtar, “Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies,” *Cancer Letters*. 2010.
- [19] J. K. Litton *et al.*, “Relationship between obesity and pathologic response to neoadjuvant chemotherapy among women with operable breast cancer,” *J. Clin. Oncol.*, 2008.
- [20] H. J. Murff *et al.*, “Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: A prospective cohort study,” *Int. J. Cancer*, 2011.
- [21] S. Sieri *et al.*, “Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition,” *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008.
- [22] S. A. Narod and A. A. Rodríguez, “Predisposicion genetica para el cancer de mama. Genes BRCA1 y BRCA2,” *Salud Publica Mex.*, vol. 53, no. 5, 2011.
- [23] K. N. Anderson, R. B. Schwab, and M. Martinez, “Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature,” *Breast Cancer Res*



- Treat*, vol. 144, no. 1, pp. 1–10, 2014.
- [24] P. Calder and R. Grimble, “Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity Fatty acids in the human diet,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 56, no. 3, pp. 14–19, 2002.
- [25] U. N. Das, “Essential fatty acids: Biochemistry, physiology and pathology,” *Biotechnology Journal*. 2006.
- [26] L. A. Saner, R. T. Dauchy, and D. E. Blask, “Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids,” *Cancer Res.*, 2000.
- [27] S. L. Goodstine *et al.*, “Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women,” *J. Nutr.*, vol. 133, no. 5, pp. 1409–1414, 2003.
- [28] M. J. McArthur, B. P. Atshaves, A. Frolov, W. D. Foxworth, A. B. Kier, and F. Schroeder, “Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids,” *J. Lipid Res.*, 1999.
- [29] P. Ferré, “The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship with Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity,” in *Diabetes*, 2004.
- [30] T. Yonezawa, K. Katoh, and Y. Obara, “Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004.
- [31] S. G. Anderson, T. A. B. Sanders, and J. K. Cruickshank, “Plasma fatty acid composition as a predictor of arterial stiffness and mortality,” *Hypertension*, 2009.
- [32] P. M. Kris-Etherton *et al.*, “Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States,” in *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000.
- [33] C. H. Byon *et al.*, “Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4,” *Lab Invest*, vol. 89, no. 11, pp. 1221–1228, 2009.
- [34] N. Serna-Marquez, S. Villegas-Comonfort, O. Galindo-Hernandez, N. Navarro-Tito, A. Millan, and E. P. Salazar, “Role of LOXs and COX-2 on FAK activation and cell migration induced by linoleic acid in MDA-MB-231 breast cancer cells,” *Cell. Oncol.*, vol. 36, no. 1, pp. 65–77, 2013.
- [35] N. Serna-Marquez, R. Diaz-Aragon, E. Reyes-Urbe, P. Cortes-Reynosa, and E. P. Salazar, “Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells,” *Med. Oncol.*, vol. 34, no. 6, pp. 1–12, 2017.
- [36] C. Rodriguez-Monterrosas, R. Diaz-Aragon, P. Cortes-Reynosa, and E. P. Salazar, “Linoleic acid induces an increased response to insulin in MDA-MB-231 breast cancer cells,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 7, pp. 5413–5425, 2018.

- [37] R. Espinosa-Neira, J. Mejia-Rangel, P. Cortes-Reynosa, and E. Perez Salazar, "Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, pp. 1782–1791, 2011.
- [38] C. Liebmann, "EGF receptor activation by GPCRs: An universal pathway reveals different versions," *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011.
- [39] J. S. Gutkind, "Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration," *Oncogene*, 2002.
- [40] R. T. Dorsam and J. S. Gutkind, "G-protein-coupled receptors and cancer," *Nature Reviews Cancer*. 2007.
- [41] Y. Liu *et al.*, "G protein-coupled receptors as promising cancer targets," *Cancer Letters*. 2016.
- [42] A. J. Brown, S. Jupe, and C. P. Briscoe, "A Family of Fatty Acid Binding Receptors," *DNA Cell Biol.*, 2005.
- [43] C. P. Briscoe *et al.*, "The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids," *J. Biol. Chem.*, 2003.
- [44] A. Hirasawa *et al.*, "Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120," *Nat. Med.*, 2005.
- [45] A. J. Brown *et al.*, "The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids," *J. Biol. Chem.*, 2003.
- [46] Y. Xiong *et al.*, "Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004.
- [47] Y. Itoh *et al.*, "Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells through GPR40," *Nature*, 2003.
- [48] N. Navarro-Tito, T. Robledo, and E. P. Salazar, "Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells," *Exp. Cell Res.*, 2008.
- [49] A. Soto-Guzman, T. Robledo, M. Lopez-Perez, and E. P. Salazar, "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.*, vol. 294, no. 1–2, pp. 81–91, 2008.
- [50] S. R. Hubbard and W. T. Miller, "Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling," *Current Opinion in Cell Biology*. 2007.
- [51] T. Regad, "Targeting RTK signaling pathways in cancer," *Cancers*. 2015.
- [52] R. Butti, S. Das, V. P. Gunasekaran, A. S. Yadav, D. Kumar, and G. C. Kundu, "Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: Signaling, therapeutic implications and challenges," *Molecular Cancer*. 2018.
- [53] S. Drube, J. Stirnweiss, C. Valkova, and C. Liebmann, "Ligand-independent

and EGF receptor-supported transactivation: Lessons from  $\beta$ 2-adrenergic receptor signalling," *Cell. Signal.*, vol. 18, no. 10, pp. 1633–1646, 2006.

- [54] H. L. Watt, G. D. Kharmate, and U. Kumar, "Somatostatin receptors 1 and 5 heterodimerize with epidermal growth factor receptor: Agonist-dependent modulation of the downstream MAPK signalling pathway in breast cancer cells," *Cell. Signal.*, 2009.
- [55] G. B. A. Ridley, M. Schwartz, K. Burridge, R. Firtel, M. Ginsberg, "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back," *Science (80-. )*, vol. 302, no. December, pp. 1704–1710, 2003.
- [56] P. Jiang, A. Enomoto, and M. Takahashi, "Cell biology of the movement of breast cancer cells: Intracellular signalling and the actin cytoskeleton," *Cancer Lett.*, vol. 284, no. 2, pp. 122–130, 2009.
- [57] L. S. Price and J. G. Collard, "Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: Implications for tumour cell invasion," *Seminars in Cancer Biology*. 2001.
- [58] D. Yamazaki, S. Kurisu, and T. Takenawa, "Regulation of cancer cell motility through actin reorganization," *Cancer Science*. 2005.
- [59] A. G. Clark and D. M. Vignjevic, "Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 36, pp. 13–22, 2015.
- [60] R. Cairns, R. Khokha, and R. Hill, "Molecular Mechanisms of Tumor Invasion and Metastasis: An Integrated View," *Curr. Mol. Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 659–671, 2003.
- [61] W. G. Stetler-Stevenson, S. Aznavoorian, and L. A. Liotta, "Tumor Cell Interactions with the Extracellular Matrix During Invasion and Metastasis," *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1993.
- [62] J. H. Exton, "Regulation of phospholipase D," *FEBS Letters*. 2002.
- [63] J. H. Exton, "Mammalian phospholipase D - properties and regulation," *Adv. Mol. Cell Biol.*, vol. 33, no. 03, pp. 451–462, 2004.
- [64] J. H. Kim *et al.*, "Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid," *FEBS Lett.*, vol. 454, no. 1–2, pp. 42–46, 1999.
- [65] J. Gomez-Cambronero, "New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer," *TheScientificWorldJournal*. 2010.
- [66] D. W. Kang *et al.*, "Autoregulation of phospholipase D activity is coupled to selective induction of phospholipase D1 expression to promote invasion of breast cancer cells," *Int. J. Cancer*, 2011.
- [67] K. M. Henkels, G. P. Boivin, E. S. Dudley, S. J. Berberich, and J. Gomez-Cambronero, "Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograph model," *Oncogene*, vol. 32, no. 49, pp. 5551–5562, 2013.

- [68] J. H. Jang, C. S. Lee, D. Hwang, and S. H. Ryu, "Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners," *Progress in Lipid Research*. 2012.
- [69] S. C. Gupta, C. Sundaram, S. Reuter, and B. B. Aggarwal, "Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy," *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2010.
- [70] M. Tafani *et al.*, "Modulators of HIF1 $\alpha$  and NFkB in cancer treatment: Is it a rational approach for controlling malignant progression?," *Frontiers in Pharmacology*. 2013.
- [71] D. Kang *et al.*, "Phorbol ester up-regulates phospholipase D1 but not phospholipase D2 expression through a PKC/Ras/ERK/NFkB-dependent pathway and enhances matrix metalloproteinase-9 secretion in colon cancer cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 7, pp. 4094–4104, 2008.
- [72] L. Hodgson, A. J. Henderson, and C. Dong, "Melanoma cell migration to type IV collagen requires activation of NF- $\kappa$ B," *Oncogene*, 2003.
- [73] T. Hu and J. H. Exton, "1-Butanol interferes with phospholipase D1 and protein kinase C $\alpha$  association and inhibits phospholipase D1 basal activity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 327, no. 4, pp. 1047–1051, 2005.
- [74] S. A. Scott *et al.*, "Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness," *Nat. Chem. Biol.*, 2009.
- [75] H. B. and C. L. R. Lavieri, S. Scott, P. Selvy, K. Kim, S. Jadhav, R. Morrison, J. Daniels, "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Halogenated N- (2-(4-Oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-8-yl)ethyl)benzamides: Discovery of an Isoform-Selective Small Molecule Phospholipase D2 (PLD2) Inhibitor," vol. 53, no. 18, pp. 6706–6719, 2010.
- [76] H. Hu, Z. Gong, N. Li, and H. Liu, "A novel class of antagonists for the FFAs receptor GPR40," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 390, no. 3, pp. 557–563, 2009.
- [77] S. M. Sparks *et al.*, "Identification of diarylsulfonamides as agonists of the free fatty acid receptor 4 ( FFA4 / GPR120 )," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 24, no. 14, pp. 3100–3103, 2014.
- [78] G. H. and L. G. W. Ward, P. Cook, A. Slater, D. Davies, "Epidermal growth factor receptor tyrosine. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor," vol. 48, no. 4, pp. 659–666, 1994.
- [79] N. Normanno *et al.*, "Epidermal growth factor receptor ( EGFR ) signaling in cancer," vol. 366, pp. 2–16, 2006.
- [80] R. M. Sutherland, "Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions : The Spheroid Model," *Science (80- )*, vol. 240, 1988.
- [81] A. M. B. Binukumar, "Dietary fat and risk of breast cancer," *World J. Surg.*

- Oncol.*, vol. 7, no. 10, pp. 790–796, 2005.
- [82] S. Abel, S. Riedel, and W. C. A. Gelderblom, “Dietary PUFA and cancer,” *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 73, no. 3, pp. 361–367, 2014.
- [83] D. P. Rose, J. M. Connolly, and X. H. Liu, “Effects of Linoleic Acid and  $\gamma$ -Linolenic Acid on the Growth and Metastasis of a Human Breast Cancer Cell Line in Nude Mice and on its Growth and Invasive Capacity In Vitro,” *Nutr. Cancer*, vol. 24, no. 1, pp. 33–45, 1995.
- [84] A. P. Simopoulos, “The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 233, no. 6, pp. 674–688, 2008.
- [85] N. Uchida, S. I. Okamura, Y. Nagamachi, and S. Yamashita, “Increased phospholipase D activity in human breast cancer,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 123, no. 5, pp. 280–285, 1997.
- [86] X. Zheng and W. B. Bollag, “AngII induces transient phospholipase D activity in the H295R glomerulosa cell model,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2003.
- [87] M. Mahankali, K. M. Henkels, and J. Gomez-Cambronero, “A GEF-to-phospholipase molecular switch caused by phosphatidic acid, Rac and JAK tyrosine kinase that explains leukocyte cell migration,” *J. Cell Sci.*, 2013.
- [88] C. Arous, M. Naïmi, and E. Van Obberghen, “Oleate-mediated activation of phospholipase D and mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates proliferation and rapamycin sensitivity of hepatocarcinoma cells,” *Diabetologia*, 2011.
- [89] S. Shaikh, N. A. Channa, F. N. Talpur, M. Younis, and N. Tabassum, “Radiotherapy improves serum fatty acids and lipid profile in breast cancer,” *Lipids Health Dis.*, 2017.
- [90] Y. Chen, V. Rodrik, and D. A. Foster, “Alternative phospholipase D/mTOR survival signal in human breast cancer cells,” *Oncogene*, vol. 24, no. 4, pp. 672–679, 2005.
- [91] Q. Ye, S. Kantonen, K. M. Henkels, and J. Gomez-Cambronero, “A new signaling pathway (JAK-Fes-phospholipase D) that is enhanced in highly proliferative breast cancer cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 14, pp. 9881–9891, 2013.
- [92] D. Silva, D. Harvey, K. Mason, R. Lloyd, F. English, “Effect of Phosphatidic Acid on Human Breast Cancer Cells Exposed to Doxorubicin,” *Cancer Invest.*, vol. 19, 2001.
- [93] S. S. Iyer and D. J. Kusner, “Association of phospholipase D activity with the detergent-insoluble cytoskeleton of U937 promonocytic leukocytes,” *J. Biol. Chem.*, 1999.
- [94] D. A. Foster, “Regulation of mTOR by phosphatidic acid?,” *Cancer Research*.

2007.

- [95] Y. C. Chae *et al.*, "Phospholipase D Activity Regulates Integrin-mediated Cell Spreading and Migration by Inducing GTP-Rac Translocation to the Plasma Membrane," *Mol. Biol. Cell*, 2008.
- [96] L. J. Norton *et al.*, "PLD1 rather than PLD2 regulates phorbol-ester-, adhesion-dependent and Fc{gamma}-receptor-stimulated ROS production in neutrophils.," *J. Cell Sci.*, 2011.
- [97] M. H. Park, B. H. Ahn, Y. K. Hong, and D. S. Min, "Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF- $\kappa$ B/Sp1-mediated signaling pathways," *Carcinogenesis*, 2009.
- [98] S. M. Knoepp *et al.*, "Effects of active and inactive phospholipase D2 on signal transduction, adhesion, migration, invasion, and metastasis in EL4 lymphoma cells," *Mol. Pharmacol.*, 2008.
- [99] J. M. Gozgit, B. T. Pentecost, S. A. Marconi, R. S. J. Ricketts-Loriaux, C. N. Otis, and K. F. Arcaro, "PLD1 is overexpressed in an ER-negative MCF-7 cell line variant and a subset of phospho-Akt-negative breast carcinomas," *Br. J. Cancer*, 2007.
- [100] M. Taborga, K. E. Corcoran, N. Fernandes, S. H. Ramkissoon, and P. Rameshwar, "G-Coupled Protein Receptors and Breast Cancer Progression: Potential Drug Targets," *Mini-reviews Med. Chem.*, 2007.
- [101] S. Hardy, G. G. St-Onge, É. Joly, Y. Langelier, and M. Prentki, "Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40," *J. Biol. Chem.*, 2005.
- [102] Q. Wu *et al.*, "Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumor-promoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma," *Oncogene*, 2013.
- [103] M. Hopkins, Z. Zhang, Z. Liu, and K. Meier, "Eicosopentanoic Acid and Other Free Fatty Acid Receptor Agonists Inhibit Lysophosphatidic Acid- and Epidermal Growth Factor-Induced Proliferation of Human Breast Cancer Cells," *J. Clin. Med.*, 2016.
- [104] P. Kelly, P. J. Casey, and T. E. Meigs, "Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric G proteins: Growth, migration, and metastasis," *Biochemistry*. 2007.
- [105] J. Juneja and P. J. Casey, "Role of G12 proteins in oncogenesis and metastasis," *British Journal of Pharmacology*. 2009.
- [106] H. Dolezalova, G. Shankar, M. C. Huang, D. D. Bikle, and E. J. Goetzl, "Biochemical regulation of breast cancer cell expression of S1P2 (Edg-5) and S1P3 (Edg-3) G protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate," *J. Cell. Biochem.*, 2003.

- [107] G. B. Mills and W. H. Moolenaar, "The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer," *Nature Reviews Cancer*. 2003.
- [108] L. O. Brandenburg, T. Pufe, and T. Koch, "Role of phospholipase D in G-protein coupled receptor function," *Membranes*. 2014.
- [109] J. T. Williams *et al.*, "Regulation of  $\mu$ -Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance," *Pharmacol. Rev.*, 2013.
- [110] S. S. Ferguson, "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling.," *Pharmacol. Rev.*, 2001.
- [111] T. Koch *et al.*, "Phospholipase D2 modulates agonist-induced  $\mu$ -opioid receptor desensitization and resensitization," *J. Neurochem.*, 2004.
- [112] R. N. Burns, M. Singh, I. S. Senatorov, and N. H. Moniri, "Mechanisms of homologous and heterologous phosphorylation of FFA receptor 4 (GPR120): GRK6 and PKC mediate phosphorylation of Thr347, Ser 350, and Ser357 in the C-terminal tail," *Biochem. Pharmacol.*, 2014.
- [113] S.-J. Watson, A. J. H. Brown, and N. D. Holliday, "Differential Signaling by Splice Variants of the Human Free Fatty Acid Receptor GPR120," *Mol. Pharmacol.*, 2012.
- [114] C. S. Lee, K. L. Kim, J. H. Jang, Y. S. Choi, P. G. Suh, and S. H. Ryu, "The roles of phospholipase D in EGFR signaling," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2009.
- [115] N. Vacaresse *et al.*, "Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids," *Circ. Res.*, 1999.
- [116] H. Daub, "Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor," *EMBO J.*, 2002.
- [117] J. Buteau, S. Foisy, E. Joly, and M. Prentki, "Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic  $\beta$ -cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor," *Diabetes*, 2003.
- [118] K. Moberaten, T. M. Haug, C. R. Kleiveland, and T. Lea, "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.*, 2013.
- [119] K. M. Henkels, H. J. Peng, K. Frondorf, and J. Gomez-Cambronero, "A Comprehensive Model That Explains the Regulation of Phospholipase D2 Activity by Phosphorylation-Dephosphorylation," *Mol. Cell. Biol.*, 2010.
- [120] Z. Freyberg, D. Sweeney, A. Siddhanta, S. Bourgoin, M. Frohman, and D. Shields, "Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells," *Mol. Biol. Cell*, 2001.
- [121] G. Du *et al.*, "Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs," *J. Cell Biol.*, 2003.

- [122] D. S. Min, E. G. Kim, and J. H. Exton, "Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in swiss 3T3 fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, 1998.
- [123] D. S. Min, B. H. Ahn, and Y. H. Jo, "Differential tyrosine phosphorylation of phospholipase D isozymes by hydrogen peroxide and the epidermal growth factor in A431 epidermoid carcinoma cells," *Mol Cells*, 2001.
- [124] D. Bai, L. Ueno, and P. K. Vogt, "Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt," *Int. J. Cancer*, 2009.
- [125] L. A. deGraffenried *et al.*, "NF-κB inhibition markedly enhances sensitivity of resistant breast cancer tumor cells to tamoxifen," *Ann. Oncol.*, 2004.
- [126] Y. Zhou, S. Eppenberger-Castori, U. Eppenberger, and C. C. Benz, "The NFκB pathway and endocrine-resistant breast cancer," in *Endocrine-Related Cancer*, 2005.
- [127] T. J. Hers I, Vicent EE, "Akt signalling in health and disease," *cell Signal.*, 2011.
- [128] J. F. Hancock, "PA promoted to manager," *Nat. Cell Biol.*, 2007.
- [129] S. Cockcroft, "Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2," *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001.
- [130] C. A. Alvarez-Breckenridge, K. A. Waite, and C. Eng, "PTEN regulates phospholipase D and phospholipase C," *Hum. Mol. Genet.*, 2007.
- [131] R. C. Bruntz, H. E. Taylor, C. W. Lindsley, and H. A. Brown, "Phospholipase D2 mediates survival signaling through direct regulation of akt in glioblastoma cells," *J. Biol. Chem.*, 2014.
- [132] D. W. Kang, K. Y. Choi, and D. S. Min, "Phospholipase D meets Wnt signaling: A new target for cancer therapy," *Cancer Research*. 2011.
- [133] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*. 2000.
- [134] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*. 2011.
- [135] D. A. Foster and L. Xu, "Phospholipase D in Cell Proliferation and Cancer," *Mol. Cancer Res.*, 2003.
- [136] K. E. Meier, T. C. Gibbs, S. M. Knoepp, and K. M. Ella, "Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1999.
- [137] G.-C. J., "Lack of effective translational regulation of PLD expression and exosome biogenesis in triple-negative breast cancer cells," *Cancer Metastasis Rev.*, 2018.
- [138] J. Meyers, J. Craig, and D. J. Odde, "Potential for Control of Signaling Pathways via Cell Size and Shape," *Curr. Biol.*, 2006.



- [139] B. M. Baker and C. S. Chen, "Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues," *J. Cell Sci.*, 2012.
- [140] A. Ivascu and M. Kubbies, "Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids," *Int. J. Oncol.*, 2007.
- [141] K. Froehlich *et al.*, "Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2016.
- [142] S. Sant and P. A. Johnston, "The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery," *Drug Discovery Today: Technologies*. 2017.
- [143] A. Al-Ramadan, A. C. Mortensen, J. Carlsson, and M. V. Nestor, "Analysis of radiation effects in two irradiated tumor spheroid models," *Oncol. Lett.*, 2018.
- [144] M. T. Nieman, R. S. Prudoff, K. R. Johnson, and M. J. Wheelock, "N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression," *J. Cell Biol.*, 1999.
- [145] D. Tamura, T. Hiraga, A. Myoui, H. Yoshikawa, and T. Yoneda, "Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone," *Int. J. Oncol.*, 2008.
- [146] M. J. Pishvaian, C. M. Feltes, P. Thompson, M. J. Bussemakers, J. A. Schalken, and S. W. Byers, "Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines," *Cancer Res.*, 1999.
- [147] D. E. White and W. J. Muller, "Multifaceted roles of integrins in breast cancer metastasis," *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2007.
- [148] S. Schlienger, R. A. M. Ramirez, and A. Claing, "ARF1 regulates adhesion of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells through formation of focal adhesions," *Cell. Signal.*, 2015.
- [149] Q. Chen *et al.*, "Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase D1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis," *Sci. Signal.*, 2012.
- [150] B. Leitinger and E. Hohenester, "Mammalian collagen receptors," *Matrix Biology*. 2007.
- [151] H. Rammal *et al.*, "Discoidin domain receptors: Potential actors and targets in cancer," *Frontiers in Pharmacology*. 2016.
- [152] H. Jing, J. Song, and J. Zheng, "Discoidin domain receptor 1: New star in cancer-targeted therapy and its complex role in breast carcinoma (review)," *Oncology Letters*. 2018.

## ANEXO ARTÍCULO