



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional**
Departamento de Biología Celular
Unidad Zacatenco

**Estudio de la participación de la proteína fascina en el proceso de migración
e invasión inducido por ácido linoleico en células de cáncer de mama
MDA-MB-231**

Tesis que presenta

M. en C. Christian González Reyes

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOLOGÍA CELULAR

Director de tesis

Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Este trabajo se realizó 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. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de una beca de doctorado, No. 392474

Este trabajo fue financiado con el apoyo económico de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), otorgados para los proyectos: a) Estudio del papel de las oxigenasas COX y LOX en los procesos de migración e invasión inducidos por el ácido graso linoleico en células cancerosas mamarias, del Subprograma de Ciencia Básica (No. 255429). b) Estudio para el establecimiento de Bio-marcadores para tamizaje de cáncer de mama, del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (No. 261637).

DEDICATORIA

A mi madre y hermana

Muchas gracias por el apoyo y el cariño.

Gracias por estar siempre conmigo, aún a la distancia.

Las amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación, por todo su apoyo y tiempo durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Mireya de la Garza Amaya, Dr. Francisco García Sierra, Dra. Mineko Shibayama Salas y Dr. Fernando A. Candanedo González por su apoyo y asesoría durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Pedro Cortes Reynoso por su apoyo dentro del laboratorio.

A Nora Ruiz y Tpor su apoyo técnico.

A Blanca Estela Olguín Cosío y Clara Hernández Chávez por su gran apoyo y disposición en labores administrativas.

A la Dra. Mónica Martínez Sierra por su apoyo en la obtención de muestras de tejido tumoral para llevar a cabo el presente trabajo. De igual manera, agradezco a la M. en C. Angélica Silva Olivares por su apoyo en la realización de los cortes histológicos de los tejidos tumorales.

A todos los compañeros del laboratorio 42, Alejandra, Javier, Eli, Ricardo, Paola, Nínive, Mileidy, Ander, Cleo, Cecilia, Dulce que pasamos muchos momentos agradables.

A mis amigos, Roger, Nancy, Nallelhy, Antonio, Ismael, Fernando, Andrés, Tania, Aidé, gracias por compartir muchos momentos durante todo este tiempo.

A todas las personas que contribuyeron o estuvieron en contacto directo durante el proceso de elaboración de este trabajo.

¡Muchas gracias!

CONTENIDO

ABREVIATURAS	7
RELACIÓN DE FIGURAS	9
RELACIÓN DE TABLAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1.0 INTRODUCCIÓN	13
1.1 CÁNCER	13
1.1.1 Estructura del tejido mamario	13
1.1.2 Cáncer de mama	14
1.1.3 Epidemiología del cáncer de mama	15
1.1.4 Factores de riesgo	16
1.1.5 Factores Genéticos	17
1.1.6 Estilo de vida y ambiente	18
1.1.7 Factores hormonales	19
1.2 MIGRACIÓN CELULAR	19
1.2.1 Mecanismos de migración celular	20
1.3 FASCINA	22
1.3.1 Estructura de fascina	23
1.3.2 Expresión y regulación	24
1.3.3 Función biológica	24
1.3.4 Fascina y cáncer	25
1.4 ÁCIDOS GRASOS Y CÁNCER MAMARIO	26
1.4.1 Ácido linoleico	27
1.5 METALOPROTEINASAS DE MATRIZ	28
1.6 RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNAS G 30 (GPR30)	29
2.0 JUSTIFICACIÓN	31
3.0 HIPÓTESIS	32
4.0 OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo General	32
4.2 Objetivos Particulares	32
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS	33

6.0 RESULTADOS	41
6.1 Expresión de fascina en líneas celulares	41
6.2 Expresión de fascina en tejido tumoral	53
6.3 Expresión de GPR30 en tejido tumoral	56
7.0 DISCUSIÓN	59
8.0 CONCLUSIÓN	63
9.0 REFERENCIAS	64

ABREVIATURAS

MB: Membrana basal

HDA: Hiperplasia ductal atípica

CDIS: Carcinoma ductal *in situ*

CDI: Carcinoma ductal invasivo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

TRH: Terapia de reemplazo hormonal

MEC: Matriz extracelular

PKC α : Proteína quinasa C alfa

p75NTR: Receptor de neurotrofina p75

RNA: Ácido ribonucleico

AGE: Ácidos grasos esenciales

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados

AL: Ácido linoleico

AA: Ácido araquidónico

AGL: Ácido gamma linoleico

ADGL: Ácido dihomo gamma linoleico

ALA: Ácido alfa linolénico

EPA: Ácido eicosapentanoico

DHA: Ácido docosahexanoico

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

TIMP: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas

TEM: Transición epitelio mesénquima

GPR30: Receptor acoplado a proteínas G 30

RE: Receptor de estrógenos

E2: 17 β -estradiol

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

PI3K: fosfoinositos 3 cinasa

EGF: Factor de crecimiento epidermal

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

HRP: Peróxidasa de rábano

DAB: Diaminobencidina

WB: Western blot

RP: Receptor de progesterona

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Progresión del carcinoma ductal de mama.

Figura 2. Esquema del proceso de migración celular.

Figura 3. Diagrama esquemático de fascina-1 y sus interacciones de unión asignados.

Figura 4. Estructuras de las metaloproteinasas de matriz.

Figura 5. AL induce sobreexpresión y relocalización de fascina a los bordes celulares a 30, 45 y 60 minutos en células MDA-MB-231.

Figura 6. AL induce aumento en la expresión de fascina en células MDA-MB-231 y MCF12A.

Figura 7. AL induce incremento en la expresión de fascina en células de cáncer mamario MDA-MB-231.

Figura 8. AL induce relocalización de fascina del citoplasma a los borde de las células MDA-MB-231 de una manera dependiente de Src.

Figura 9. AL induce incremento en la expresión y relocalización de fascina del citoplasma a los borde de las células de cáncer mamario ZR-75.

Figura 10. AL induce migración en células MDA-MB-231.

Figura 11. AL induce migración a través de una vía dependiente de fascina en células MDA-MB-231.

Figura 12. AL induce formación de contactos focales y colocación de fascina y paxilina.

Figura 13. AL induce invasión a través de una vía dependiente de fascina en células MDA-MB-231.

Figura 14. AL induce incremento en la secreción de MMP-9 de una manera dependiente de fascina en células MDA-MB-231.

Figura 15. Control utilizado para la estandarización del protocolo de inmunohistoquímica para la determinación de expresión de fascina.

Figura 16. Tinción de hematoxilina y eosina de tejido tumoral.

Figura 17. Técnica de inmunohistoquímica para determinar la expresión de fascina.

Figura 18. Control utilizado para la estandarización del protocolo de inmunohistoquímica para la determinación de expresión de GPR30.

Figura 19. Técnica de inmunohistoquímica para determinar la expresión de GPR30.

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Características clínico-patológicas de pacientes con cáncer mamario.

Tabla 2. Asociación entre la expresión de GPR30 y características clínico-patológicas.

RESUMEN

Estudios epidemiológicos sugieren fuertemente una asociación entre altos niveles de ingesta de grasas en la dieta y un riesgo incrementado de desarrollar cáncer de mama. El ácido linoleico (AL) es un ácido graso poliinsaturado esencial omega-6 y el principal ácido graso en las dietas occidentales. En células de cáncer de mama, el ácido linoleico induce expresión del inhibidor-1 del activador de plasminógeno, proliferación, migración e invasión. Fascina es una proteína globular entrecruzadora de actina que genera haces de actina hechos de filamentos paralelos de actina, los cuales participan en la formación y estabilidad de microespículas, fibras de estrés, lamelipodios y filopodios. Sin embargo, el papel de fascina en la migración e invasión inducida por AL en células de cáncer de mama MDA-MB-231 aún no ha sido estudiado. En este trabajo demostramos que el AL induce un incremento de la expresión de fascina en células MDA-MB-231 y células epiteliales mamarias no tumorales MCF12A. Particularmente, el AL induce la formación de filopodios y lamelipodios y la localización de fascina en estas estructuras de actina en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Sin embargo, AL solo induce la formación de microespículas y la localización de fascina en estas estructuras de actina en células epiteliales mamarias no tumorigénicas MCF12A. Además, el AL induce migración, invasión, y secreción de metaloproteinasa-9 de matriz a través de una vía dependiente de fascina en células MDA-MB-231. En resumen, nuestros hallazgos demuestran que fascina es requerida para la migración e invasión inducida por AL en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

ABSTRACT

Epidemiological studies strongly suggest an association between high levels of dietary fat intake and an increased risk of developing breast cancer. Linoleic acid (LA) is an essential omega-6 PUFA and the major fatty acid in occidental diets. In breast cancer cells, LA induces expression of plasminogen activator inhibitor-1, proliferation, migration, and invasion. Fascin is an actin crosslinker globular protein that generates actin bundles made of parallel actin filaments, which mediate formation and stability of microspikes, stress fibers, membrane ruffles, and filopodia. However, the role of fascin in migration and invasion induced by LA in MDA-MB-231 breast cancer cells remains to be studied. We demonstrate here that LA induces an increase of fascin expression in MDA-MB-231 and MCF12A mammary epithelial cells. Particularly, LA induces the formation of filopodia and lamellipodia and the localization of fascin in these actin structures in MDA-MB-231 breast cancer cells. However, LA only induces formation of microspikes and the localization of fascin in these actin structures in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF12A. In addition, LA induces migration, invasion, and matrix metalloproteinase-9 secretion through a fascin-dependent pathway in MDAMB-231 cells. In summary, our findings demonstrate that fascin is required for migration and invasion induced by LA in MDA-MB-231 breast cancer cells.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

Cáncer es un término genérico para un gran grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo, otros términos utilizados son neoplasias y tumores malignos. Una de las características que define el cáncer es la generación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites normales y pueden invadir zonas adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos, éste proceso se conoce como metástasis. El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, lo que representó 8,8 millones de muertes en 2015 [1].

1.1.1 Estructura del tejido mamario

La glándula mamaria está compuesta de células epiteliales ductales, células epiteliales alveolares productoras de leche, embebidas en tejido conectivo estromal y la almohadilla de grasa mamaria [2]. El epitelio mamario es una estructura compuesta de dos capas de células epiteliales. La capa continua interior contiene células epiteliales lumbinales y la capa exterior de células mioepiteliales. La bicapa epitelial es polarizada; la capa apical (células epiteliales lumbinales) se encuentra formando el lumen de los conductos y los alvéolos, y la capa basal (células mioepiteliales) está en estrecho contacto con una membrana basal (MB) rica en laminina y colágena tipo IV. El epitelio mamario está inserto en el estroma mamario, lo que representa más del 80% del volumen total del seno, el cual está constituido por tejido graso, tejido conectivo denso interlobular e intralobular y vasos sanguíneos [3]. En el seno humano normal solo un 20% de las células lumbinales se encuentran en contacto con la lámina basal y el resto está en contacto directo con las células mioepiteliales. La relación precisa que existe entre las células epiteliales lumbinales y las células mioepiteliales, así como el origen de esas células se desconoce, pero se ha demostrado que una porción de las células epiteliales lumbinales al ser cultivadas en medios de cultivo apropiados dan lugar a células mioepiteliales, pero las células mioepiteliales no dan lugar a células epiteliales lumbinales [4].

1.1.2 Cáncer de mama

Es una proliferación maligna de células epiteliales que reviste los ductos o lóbulos de las glándulas mamarias. La enfermedad es heterogénea, se forma dentro de los ductos de la mama o lóbulos, siendo sugerido que hay múltiples vías de progresión a cáncer invasivo. Un paradigma posible para la progresión del cáncer de mama ductal, que representa el 80% de todos los diagnósticos, es de la patología normal a través de la hiperplasia ductal atípica (HDA) para el carcinoma ductal *in situ* (CDIS), a continuación el carcinoma ductal invasivo (CDI), culminando en enfermedad metastásica (Fig. 1) [5]. El CDIS se puede definir como una proliferación de las células cancerosas situadas dentro de los confines del ducto de la mama. La invasión del cáncer de mama ductal, por lo tanto, requiere que las células cancerosas rompan la membrana basal de las células epiteliales y migren fuera del ducto hacia el tejido circundante. En consecuencia, los cánceres invasivos pueden diseminarse hacia el tejido circundante, producir vasculatura local y metástasis a sitios distantes, lo que a menudo conduce a la muerte eventual en muchos pacientes con cáncer [6].

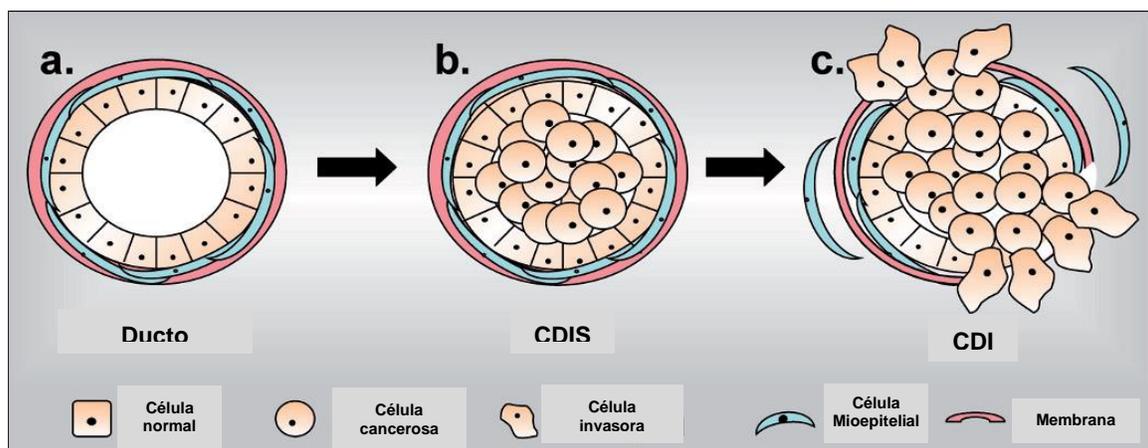


Figura 1. Progresión del carcinoma ductal de mama. A) El ducto normal consiste de una capa delgada de células epiteliales revistiendo el lumen del ducto. B) El carcinoma ductal *in situ*, etapa en la que las células cancerosas proliferan hasta llenar el ducto de la mama. C) Carcinoma ductal invasivo, etapa en la que disminuye la presencia de células mioepiteliales y donde las células cancerosas ductales han ramificado a la membrana basal e invaden el estroma que las rodea. Tomada de McSherry, *Cel Mol Life Sci*, 2007.

1.1.3 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es el principal cáncer en las mujeres, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. La incidencia de cáncer de mama está aumentando en países en desarrollo debido al aumento de la esperanza de vida, aumento en la urbanización y la adopción de estilos de vida occidentales. Estimándose que en todo el mundo se diagnostican cerca de 1,38 millones de casos anualmente; mientras que más de 508,000 muertes se reportaron en 2011 a causa de cáncer de mama [7, 8].

Mediante estudios epidemiológicos, el mundo se divide en varias regiones geográficas que se caracterizan por tener como miembros a países desarrollados (Australia y Nueva Zelanda, Japón, América del Norte y Europa), o bien, a países en desarrollo (América Latina, África y Asia). Existe una variación importante en la incidencia de cáncer de mama entre todas las regiones siendo de 19,3 por cada 100.000 mujeres en África Oriental a 89,7 por cada 100,000 mujeres en Europa occidental. En la mayoría de las regiones en desarrollo, las tasas de incidencia están por debajo de 40 por 100,000 mujeres. Las tasas de incidencia más bajas se encuentran en la mayoría de los países africanos, sin embargo, la incidencia de cáncer de mama en estos países también está aumentando [8, 9].

En el año 2013, en Estados Unidos se reportaron 234,580 nuevos casos de cáncer de mama, falleciendo alrededor de 40,030 individuos por ésta causa [10]. En el caso de México, la Secretaría de Salud sitúa al cáncer de mama como la primera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres, desplazando desde 2006 al cáncer cérvico-uterino, convirtiéndose en un serio problema de salud pública para nuestro país [11]. La mortalidad por cáncer ha aumentado en general en México, de 58 casos por 100,000 habitantes en 1998, a 67 casos por 100,000 habitantes en 2008. Desde el año 2006, el cáncer de mama ha sido la principal causa de mortalidad por cáncer en las mujeres mexicanas, representando el 14% de las muertes relacionadas con el cáncer [7, 11]. La predicción de GLOBOCAN es que en 2030, 24,386 mujeres serán diagnosticadas y 9778 (40%) van a morir de cáncer de mama en México, lo que convierte a esta enfermedad un reto importante para el sistema

de atención de salud [7, 9]. En la actualidad, es la segunda causa de muerte en mujeres de 30-54 años de edad y la tercera causa de muerte en mujeres de 30-59 años, sólo detrás de la diabetes y de las enfermedades cardiovasculares [7, 11].

1.1.4 Factores de riesgo

El cáncer de mama es de etiología multifactorial. Se conocen varios factores de riesgo que predisponen a padecer cáncer de mama en la población. Los factores de riesgo más importantes para el cáncer de mama incluyen la edad, factores reproductivos y genéticos, así como el estilo de vida y factores hormonales [12, 13].

Edad

El envejecimiento es uno de los mayores factores de riesgo individuales para el desarrollo de cáncer de mama. La incidencia de cáncer de mama tiene una curva distintiva específica de la edad, con un estimado de 64% de las mujeres mayores de 55 años en el momento de diagnóstico de cáncer de mama. En los Estados Unidos de América, el riesgo estimado de cáncer de mama es de 1 en 13 para las mujeres 60 a 79 años de edad, en comparación con 1 de cada 24 mujeres de 40 a 59 y 1 de cada 229 mujeres de 39 años o menos [12].

Factores reproductivos

Los factores reproductivos aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama, en particular una disminución en la edad de la menarca, el aumento de la edad al primer embarazo, y la nuliparidad [13].

- ✓ **Menopausia:** las mujeres que experimentan la menopausia a una edad avanzada corren un mayor riesgo de padecer cáncer de mama que las que dejan de menstruar antes. Cada año de retraso en el inicio de la menopausia se asocia con un aumento del 3% en el riesgo de padecer cáncer de mama [14].
- ✓ **Edad de la menarca:** 1 año de retraso en la aparición de la menarca se asocia con una reducción del 5% en el riesgo de desarrollar cáncer de mama

en la vida posterior [15]. Inicio de la menarca a los 11 años o antes, es considerado un factor de riesgo de cáncer de mama establecido y el inicio de la menarca a los 15 años o más es considerado un factor de protección [16].

- ✓ **Paridad:** Las mujeres con nuliparidad y la primera gestación posterior a los 30 años, tienen el doble de riesgo de presentar cáncer de mama en comparación con aquellas que tienen el primer embarazo antes de los treinta años de edad [17]. Tener al menos un hijo está asociado con una disminución en el riesgo a largo plazo de desarrollar cáncer de mama. Este efecto protector aumenta con el número de hijos. Cada nacimiento reduce el riesgo relativo de cáncer de mama en un promedio del 7% [18].
- ✓ **Lactancia materna:** el papel de la lactancia materna en la reducción del riesgo de cáncer de mama se ha sospechado desde hace casi un siglo. Los resultados de una revisión de la evidencia epidemiológica permanece poco concluyente, indicando que no hay asociación o un efecto protector débil contra el cáncer de mama [19].

1.1.5 Factores Genéticos

Los factores genéticos contribuyen al 10% del total de los cánceres de mama y se presenta en mujeres con mutaciones en los genes que codifican para las proteínas BRCA1 y BRCA2. Estas proteínas participan en mecanismos de reparación del DNA, control del ciclo celular y recombinación genética. El riesgo de por vida de desarrollar cáncer de mama para portadores de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 es del 80-85% [20]. Las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama tienen un mayor riesgo de la enfermedad, estimándose, basado en 53 estudios epidemiológicos, que el tener un familiar en primer grado con cáncer de mama aumenta el riesgo en un 80%, dos familiares de primer grado aumenta el riesgo aproximadamente tres veces, y en aquellos con tres o más familiares de primer grado el riesgo es elevado por cuatro veces [21].

1.1.6 Estilo de vida y ambiente

En la actualidad varias características de estilo de vida han sido relacionadas con el cáncer de mama, entre las que se incluyen la dieta, obesidad, consumo de alcohol y tabaco [12, 13].

Tipo de dieta. El papel de los factores específicos de la dieta en la etiología del cáncer de mama no se ha resuelto por completo. Se ha sugerido una relación entre el consumo de carne, productos lácteos, la dieta rica en grasas, la fibra y el cáncer de mama [12].

Obesidad. La obesidad está asociada con un mayor riesgo de cáncer de mama en mujeres post-menopausia, en particular, el efecto de las grandes ganancias de peso después de los 18 años [22], así como con el riesgo de aumentar en un 2% por unidad de índice de masa corporal [23].

Alcohol. Es el factor de riesgo de la dieta mejor establecido para el cáncer de mama y se ha sugerido como un factor de riesgo en la mayoría de los estudios [24, 25]. Algunos estudios de cohortes han mostrado un aumento de un 30% en el riesgo de cáncer de mama en las bebedoras [26, 27], mientras que por cada 10 g adicionales en el consumo de alcohol por día, el riesgo aumenta en aproximadamente un 7% [25].

Tabaco. A pesar de una considerable investigación, la relación del tabaco con el cáncer de mama sigue siendo polémica. Un problema importante ha sido que el consumo de alcohol y de tabaco está estrechamente correlacionado. En un análisis de reportes individuales de 53 estudios epidemiológicos, el tabaquismo tuvo poco o ningún efecto sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama [25].

Ambiente. Los estudios de inmigrantes han mostrado la primera evidencia sólida de que los factores ambientales son más importantes, incluso que los factores genéticos. Se ha observado que las personas que migran de un lugar de bajo riesgo (como los países asiáticos) hacia uno con alta incidencia (EUA) aumentan

considerablemente la probabilidad de padecer cáncer de mama, además de que su progenie presentará un mayor riesgo durante generaciones sucesivas [28].

1.1.7 Factores hormonales

Se ha sugerido un aumento en el riesgo de cáncer de mama en mujeres con exposición a hormonas exógenas, como los anticonceptivos orales y la terapia de reemplazo hormonal (TRH) [29, 30].

Uso de anticonceptivos orales. Los anticonceptivos orales por periodos prolongados pueden producir un ligero aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, esto puede ocurrir por el hecho de que los estrógenos y la progesterona promueven la proliferación y diferenciación del epitelio mamario [31]. En un meta-análisis de 54 estudios publicados, el riesgo de cáncer de mama aumenta alrededor del 25% en usuarios de anticonceptivos orales combinados, pero el exceso de riesgo disminuye después del cese del uso, de modo que 10 años o más después de que se suspende el uso, no es evidente un aumento significativo del riesgo.[29].

Uso de TRH. La TRH ha sido un tema controvertido en la literatura sobre el cáncer de mama. Un estudio confirmó un aumento en el riesgo de cáncer de mama de alrededor de 26% en el uso por más de 5,2 años de TRH con la combinación de estrógeno-progestágeno [32]. Estudios más recientes han reportado que el uso a largo plazo de las preparaciones que contienen progestágeno es de mayor riesgo que solo el uso de estrógenos [33].

1.2 MIGRACIÓN CELULAR

Los mecanismos por los que se lleva a cabo la invasión en cáncer de mama son complejos y multifactoriales. Aunque los objetivos de control de la proliferación de células tumorales y la apoptosis han atraído mucha atención en los últimos años, se debe recordar que las funciones adicionales, tales como la adquisición de un fenotipo móvil son esenciales para que las células tumorales se conviertan en invasoras. Esto ha sido puesto en evidencia por estudios recientes que demuestran

que las células invasoras en los márgenes de los tumores de ratón muestran perfiles genéticos que son no proliferativas y no apoptóticas en relación con el tumor principal, pero cuentan con una sobre-regulación significativa de los genes que controlan la motilidad celular [34].

La migración celular es de fundamental importancia para una gran variedad de funciones fisiológicas en todos los seres vivos: alimentación, embriogénesis, respuesta inflamatoria, reparación y regeneración de tejidos, entre otros [35]. La migración celular es también de importancia crítica en entornos fisiopatológicos tales como el cáncer. En el contexto del carcinoma de mama, la capacidad de las células epiteliales en el borde de un tumor confinado histológicamente para migrar lejos del sitio primario es un determinante temprano de la transición de un fenotipo *in situ* en un fenotipo invasivo [6].

1.2.1 Mecanismos de migración celular

La migración celular se puede dividir en dos tipos, la migración de una sola célula, realizado por los leucocitos y fibroblastos, y la migración coordinada de células, también llamada colectiva o cohesiva, que se observa en las superficies de barrera del cuerpo, incluyendo los epitelios y endotelios. Tanto la migración de una sola célula y la migración celular coordinada implican secuencias dinámicas y cíclicas de eventos que se pueden resumir de la siguiente manera [36]. El primer paso implica la extensión de un saliente en la dirección deseada del movimiento. Estas protuberancias son delgadas, filopodios tipo pelos y grandes protuberancias citoplasmáticas tipo velo conocidas como lamelipodios, que son inducidas por GTPasas pequeñas de la familia de Rho: Cdc42 y Rac1 respectivamente, por su parte Rho induce la formación de fibras de estrés [37, 38]. El segundo paso requiere la estabilización de esta interacción a través del ensamblado de adhesiones focales transitorias con la matriz extracelular (MEC), formados a través de la agrupación de integrinas en la membrana celular con el subsiguiente reclutamiento de proteínas adaptadoras, como paxilina, talina o vinculina, formando un puente entre la membrana celular y la red de fibras de estrés de actina F, mientras que el

ensamblaje y desensamblaje de estas adhesiones en los frentes de migración están reguladas por las proteínas FAK y Src [6, 39]. El tercer paso implica la contracción de esta red mediada por las interacciones entre F-actina y la cadena ligera recién fosforilada de la miosina II, en un proceso que genera la suficiente tensión para arrastrar la célula hacia adelante. El cuarto y último paso requiere el desmontaje de los contactos focales unidos a F-actina en la parte trasera de la célula, la cual depende de la actividad de la proteasa calpaína, ésta proteína degrada componentes de los contactos focales incluyendo talina, FAK y paxilina. Conjuntamente con este evento, la fosforilación en la serina 910 en FAK permite la disociación de los sitios de adhesión focal, induciendo el desensamblaje de estos contactos, permitiendo que la célula se retraiga y ser arrastrada en la dirección de la migración [40, 41]. El ciclo comenzará de nuevo, lo que resulta en un avance continuo hacia el frente, siempre que las condiciones microambientales favorecen la migración (Fig. 2).

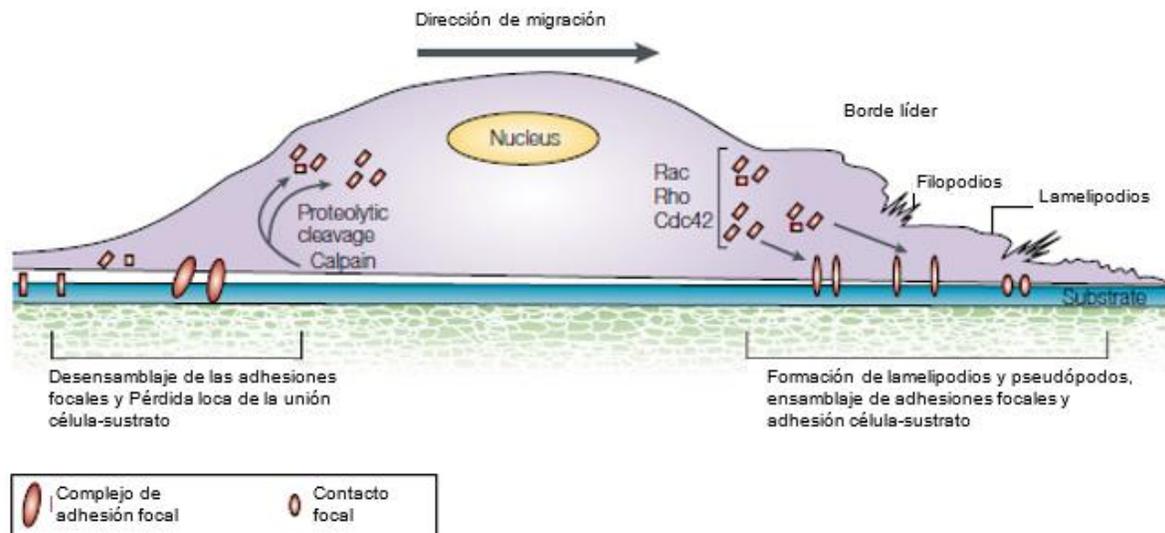


Figura 2. Esquema del proceso de migración celular. La migración requiere la formación de contactos focales en la parte anterior de la célula y el desensamblaje de estos contactos en la parte posterior de la célula. La formación de los contactos focales va a conllevar arreglos del citoesqueleto a través de la actividad GTPasa de la familia Rho. Modificada de Frame MC, 2002.

El modelo de migración fue desarrollado para explicar la migración celular sobre superficies planas en los sistemas de dos dimensiones, con la adición de un paso, es aceptado que también se produce dentro de los entornos tridimensionales más complejos, incluyendo MEC *in vivo*, este paso adicional implica el reclutamiento de enzimas que degradan la matriz, tales como las metaloproteinasas de MEC en los sitios donde los complejos de integrina se han agrupado, lo que permite la proteólisis localizada de la MEC y la extensión hacia abajo de proyecciones celulares conocidos como invadopodios [42]. Este evento se produciría después de la formación de complejos focales y antes de los eventos de contractilidad de actomiosina que generan la tensión necesaria para arrastrar el cuerpo de la célula hacia adelante [6].

1.3 FASCINA

Fascina fue descubierta en la década de 1970 como una proteína de unión a actina de 55 kDa que fue purificada de extractos citoplásmicos de ovocitos o coelomiositos de erizo de mar [43, 44]. Esta proteína fue denominada fascina por su capacidad de formar lazos estables y apretados con actina F (del latín, *fasiculus*, un lazo) [44]. Fascina está altamente conservada en la evolución animal: homólogos están presente en *Drosophila*, equinodermos y en el platelminto *Schmidtea mediterránea* [45, 46]. El genoma de vertebrados codifica tres formas de fascina: fascina-1, que es ampliamente expresada en tejido mesenquimal y en el sistema nervioso; fascina-2, que es expresada por las células fotorreceptoras de la retina; y fascina-3, que es específica de testículo [46-49]. En humanos, el gen que codifica a fascina-1 está localizado en el cromosoma 7p22, codifica un polipéptido de 493 aminoácidos que es diferente en secuencia de todas las otras proteína de unión a actina [50]. El gen para fascina-2 está en 17q25, mientras que el gen para fascina-3 está localizado en 7q31 [49, 51]. Fascina-1 es la de particular importancia, puesto que se ha demostrado que contribuye en la organización de dos formas principales de estructuras basadas en actina: proyecciones celulares corticales que participan en las interacciones celulares y la migración, así como lazos de microfilamentos

citoplásmicos que contribuyen a la arquitectura celular y al movimiento intracelular [50].

1.3.1 Estructura de fascina

El análisis de la secuencia y la estructura cristalográfica de fascina reveló que es un miembro de la familia de proteínas de pliegue β -trébol y está constituida de cuatro dominios β -trébol [52]. Un análisis reciente ha demostrado que cada uno de esos dominios β -trébol está compuesto de seis β -giros de doble hebra [53]. Para entrelazar F-actina, fascin-1 debe contener dos sitios de unión a actina. Un sitio se encuentra en el extremo amino, en el primer dominio β -trébol entre los aminoácidos (aa) 33-47, y el otro ha sido deducido por proteólisis limitada que se encuentra entre los aa 277 a 493 [46]. Fascin-1 es un sustrato de la proteína quinasa C alfa ($PKC\alpha$) “in vitro” y en células intactas [54, 55]. El sitio altamente conservado de fosforilación, serina (ser)-39, se encuentra dentro del sitio 1 de unión a actina y la fosforilación de fascina en Ser-39 inhibe la capacidad de fascina de unirse a actina y la formación de protrusiones de fascina por células adherentes a MEC, además confiere una actividad adicional, la unión del dominio regulador de la $PKC\alpha$ activa. Esta última interacción se ha mapeado en el dominio C1 de la $PKC\alpha$ [56]. Una tercera interacción de fascina-1 es con el dominio citoplásmico del receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) [57]. Esta unión depende del tercero y cuarto dominios β -trébol de fascina-1 (Fig. 3).

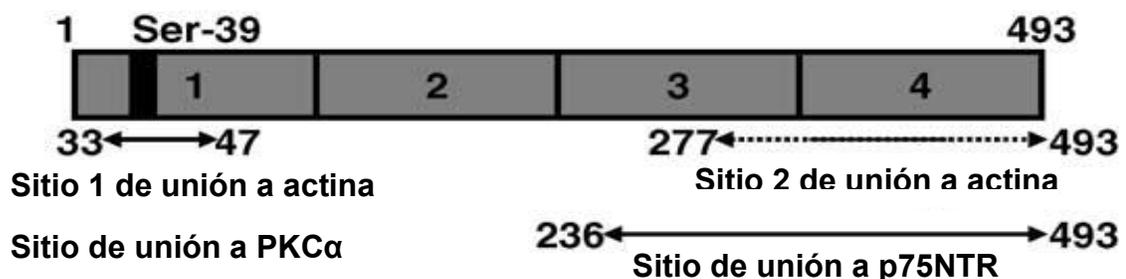


Figura 3. Diagrama esquemático de fascin-1 y sus interacciones de unión asignados. Los cuatro dominios β -trébol están enumerados 1-4. La numeración de aminoácidos corresponde a fascin-1 humana.

1.3.2 Expresión y regulación

Todos los transcritos de fascina son expresados principalmente en el desarrollo embrionario de ratón dentro del sistema nervioso, somitas y mesénquima, las cuales son todas regiones de diferenciación y migración celular activa [47]. En tejidos de humano adulto, fascina es expresada en células endoteliales, células neuronales, fibroblastos así como células dendríticas pero está ausente en células epiteliales no transformadas y estratificadas diferenciadas terminalmente [58]. Existe evidencia que sugiere que las vías de señalización de TNF- α , IGF-1 e IL-6 pueden específicamente sobrerregular la expresión de fascina en ciertas células cancerosas, pero el mecanismo por el cual esto sucede permanece desconocido [59-61], mientras que estudios recientes identificaron que el microRNA 145 (miRNA) actúa para regular negativamente los niveles de RNAm de fascina tanto en células normales [62] y cancerosas [63, 64]. Además de actina, fascina se une a un pequeño número de otras proteínas que pueden regular la actividad o función. La proteína mejor caracterizada es la proteína cinasa C (PKC, isoformas α y γ) que se une a una fascina fosforilada en ser-39 dentro del amino terminal resultando en la pérdida de unión a actina por fascina [65]. La pequeña GTPasa Rac actúa río arriba de fascina [66] actuando sobre el complejo fascina-PKC, a través del efector de Rac PAK1 [67].

1.3.3 Función biológica

Fascina regula el ensamblaje de las fibras de actina en una variedad de diferentes contextos; algunos estudios se han enfocado en el papel de fascina en el ensamblaje de protrusiones periféricas ricas en actina, mientras que estudios recientes han demostrado papeles más específicos para fascina en la formación y rotación de estructuras adhesivas. El estudio demostró un papel para fascina en la regulación de la estabilidad de la adhesión focal. En células de carcinoma de colon humano donde se inhibe la expresión de fascina resultó en una dinámica de adhesión disminuida y una subsecuente reducción en la migración celular [68]. Fascina es reclutada a dos tipos de estructuras adhesivas, podosomas e

invadopodios. Específicamente, fascina se localiza en los núcleos ricos en actina de podosomas en células de músculo liso donde promueve la estabilidad de adhesión y migración [62]. De manera similar, fascina es localizada en invadopodios en una variedad de líneas celulares de carcinoma humano donde también actúa para regular la estabilidad de adhesión, en una manera dependiente de PKC, conduciendo a una mayor invasión [69].

1.3.4 Fascina y cáncer

Fascina es sobreexpresada, tanto a nivel de RNAm como de proteína, en diferentes tipos de cáncer humano entre los que se incluyen colon, páncreas, mama, pulmón, esófago, estómago, piel y ovario. La expresión de fascina correlaciona de manera directa con tumores clínicamente agresivos y por lo tanto, recientemente ha recibido considerable atención tanto como marcador pronóstico potencial y como blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad metastásica [70]. Puesto que fascina juega un papel clave en el ensamblaje y estabilidad de los lazos ricos en actina dentro de estructuras protrusivas en las células, es posible que la sobre regulación de fascina en enfermedad metastásica *in vivo* pueda promover invasión celular a través del ensamblaje del citoesqueleto. De acuerdo a la propuesta, diversos estudios han demostrado roles claros para fascina en modelos de ratón en la formación de tumor. En dos estudios se demostró que las células de carcinoma de colon que expresan establemente shRNA para inhibir la expresión de fascina mostraron una disminución del crecimiento tumoral y en el desarrollo del tumor por xenotransplantes en modelos murinos [68, 71]. En otro estudio se ha identificado a fascina como el blanco primario para el agente antitumoral migrastatina, un producto natural secretado por *Streptomyces*, los datos demostraron que la migrastatina se une a fascina en el sitio de unión a actina y por lo tanto inhibe *in vivo* la invasión dependiente de fascina [53].

1.4 ÁCIDOS GRASOS Y CÁNCER MAMARIO

Los ácidos grasos participan en numerosos procesos biológicos, siendo utilizados como fuente de energía, así como precursores de moléculas estructurales y de señalización celular [72, 73]. El pescado, aceites de pescado y algunos aceites vegetales son fuentes ricas en ácidos grasos esenciales. Diversos estudios han correlacionado positivamente los ácidos grasos esenciales con la reducción de la morbilidad y mortalidad cardiovascular, el desarrollo infantil, la prevención del cáncer, funcionamiento visual y cerebral óptimo, la artritis, la hipertensión, la diabetes mellitus y los trastornos neurológicos/neuropsiquiátricos. Sin embargo, el alto consumo de grasas [74], y posiblemente el alto consumo de ácidos grasos específicos [75], son moduladores importantes del riesgo de padecer cáncer de mama como se ha mostrado en estudios epidemiológicos y en animales [76].

Los mecanismos moleculares por los que la grasa de la dieta puede influir en el desarrollo del cáncer son potencialmente numerosos; se ha demostrado que los ácidos grasos de la dieta modulan la expresión génica dando como resultado cambios en el metabolismo, la diferenciación celular, y la proliferación [77]. Además, la respuesta celular a la grasa se puede esperar que dependa del tipo de grasa, y composición de ácidos grasos, el metabolismo específico de las células y factores de transcripción específicos de células y receptores nucleares [77]. Los efectos de la grasa de la dieta en el desarrollo de tumores también pueden ser indirectos a través de la modulación de síntesis de hormonas [78] o las vías de señalización mediadas por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 [79]. Además, el estrés oxidativo debido a la generación de especies reactivas de oxígeno a partir de ácidos grasos puede contribuir al efecto de promoción de las grasas de la dieta en la peroxidación lipídica y el daño al DNA y proteínas [80]. Además, el metabolismo de los ácidos grasos de la dieta a través de las vías de la ciclooxigenasa o lipoxigenasa puede alterar la expresión génica a través de la regulación de proteínas G implicadas en las cascadas de transducción de señales [77, 81].

El término ácidos grasos esenciales (AGE) se refiere a aquellos ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que deben ser proporcionados por los alimentos debido a

que estos no pueden ser sintetizados en el cuerpo, pero son necesarios para la salud [82]. Los ácidos grasos esenciales pertenecen a dos familias, los ácidos grasos omega-3 (ω -3) y omega-6 (ω -6). Los ácidos grasos ω -3 tienen en común un doble enlace final carbono-carbono en la posición ω -3, es decir, el tercer enlace desde el extremo metilo del ácido graso, mientras que los ácidos grasos ω -6 lo tienen en la posición ω -6, es decir, el sexto enlace desde el extremo metilo del ácido graso. Los ácidos grasos del grupo ω -6 incluyen un precursor, el ácido linoleico (AL, 18:2 Δ 9,12), el ácido gamma linoleico (AGL, 18:3 Δ 6, 9, 12), el ácido dihomo gamma linoleico (ADGL 20:3 Δ 8, 11, 14) y ácido araquidónico (AA, 20:4 Δ 5, 8, 11, 14). Los ácidos grasos del grupo ω -3 incluye un ácido graso esencial, el ácido alfa linolénico (ALA, 18:3 Δ 9, 12, 15) y derivados altamente insaturadas tales como el ácido eicosapentanoico (EPA 20:5 Δ 5, 8, 11, 14, 17) y el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 Δ 4, 7, 10, 13, 16, 19).

1.4.1 Ácido linoleico

El ácido linoleico (AL) es un ácido graso esencial y el principal ácido graso poliinsaturado presente en la mayoría de las dietas, siendo necesario para la biosíntesis de eicosanoides a partir de la producción de AA. Este ácido graso es abundante en cártamo, girasol y maíz; presente en cantidades medias en la soya, sésamo y almendras, así como en pequeñas cantidades en los aceites de canola, maní y aceite de oliva. El cuerpo convierte AL en otros ácidos grasos, dependiendo de la necesidad [83]. La ingesta de AL se ha duplicado durante los últimos 100 años, debido al aumento en el uso de los aceites de maíz y cártamo. Las dietas altas en AL y bajas en ácidos grasos ω -3 pueden llevar a la inflamación crónica, la hipertensión arterial y la coagulación de la sangre que aumenta el riesgo de infarto al corazón y accidente cerebrovascular [84]. En células de cáncer de mama, el AL induce expresión del inhibidor-1 del activador de plasminógeno, proliferación, migración e invasión, mientras que en células epiteliales mamarias bovinas, el AL promueve un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y proliferación [85-87].

1.5 METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Múltiples estudios sugieren que la progresión de los tumores depende de las propiedades intrínsecas de las células cancerosas, como su capacidad para migrar e invadir. Además, muchos factores extrínsecos, como las proteínas de la MEC, también son cruciales para la regulación de la metástasis del cáncer. Las proteínas de la MEC que componen la MB, tales como elastina, colágeno, fibronectina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos funcionan como una barrera para la invasión celular [88]. Sin embargo, la MB que es rica en laminina y colágeno IV, también proporciona el sustrato para la adhesión de las células tumorales migratorias y la degradación promueve la liberación/activación de diversos factores de crecimiento necesarios para la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis [89, 90].

Las enzimas de degradación de la MEC conocidas como metaloproteinasas de matriz (MMPs) son importantes reguladores de una variedad de funciones biológicas tales como la angiogénesis, reparación del tejido, morfogénesis y también participan en diversos procesos patológicos como el cáncer, enfermedad cardiovascular, artritis, inflamación y diabetes, entre otros [91-93]. Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que escinden moléculas de ECM y se subdividen en categorías según su especificidad de sustrato y la estructura de la enzima. La familia de enzimas MMPs incluye no solo las MMPs secretadas y unidas a membrana clásicas, sino también las ADAM, una desintegrina y metaloproteinasa. Los mecanismos principales de regulación pos-transcripcional de la actividad de las MMPs son: 1) Las MMPs son secretadas como precursor latente (zimógeno), 2) La inhibición de la enzima activa por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) [94].

La estructura básica de las MMPs presenta una serie de dominios característicos: péptido señal que dirige la secreción al exterior de célula, un propéptido que mantiene a la enzima inactiva hasta que sufre un corte proteolítico y un dominio catalítico carboxiterminal que une zinc. Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes, como un dominio de tipo hemopexina que participa en la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, así como

un dominio transmembranal en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática (Fig. 4) [95, 96].

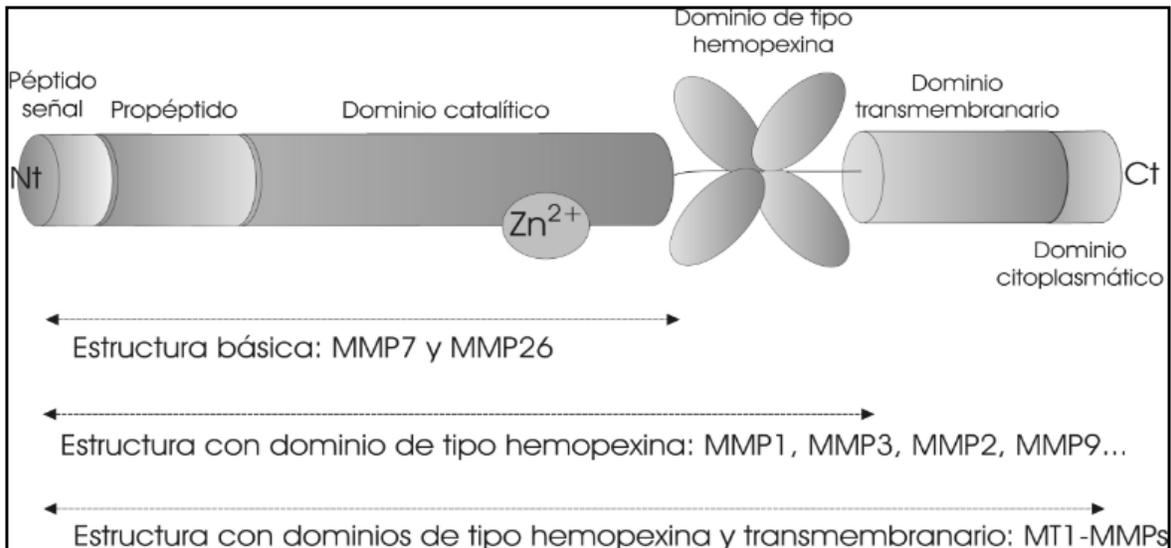


Figura 4. Estructuras de las metaloproteinasas de matriz. Dominios estructurales variables de las MMPs. Todas las MMPs poseen un péptido señal que dirige a las MMPs para la secreción, un dominio propéptido, y un dominio catalítico. Se muestran todas las regiones características que muestran modificaciones dentro de la familia.

Cuando las células tumorales comienzan a migrar, rompen la MB mediante la acción de proteínas como la MMP-2, MMP-8, MMP-9, ADAMs10 y 13. Así como también se ha reportado que la expresión elevada de la MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13 y 14 en diferentes tipos de cáncer se correlaciona positivamente con la progresión tumoral, la metástasis y el mal pronóstico general [97-101]. La MMP-2 y la MMP-9 están implicadas en transición epitelio mesénquima (TEM), ya que como se ha reportado tienen como principal sustrato la colágena tipo IV, laminina y la parte extracelular de E-cadherina, su activación las convierte en las principales responsables de la pérdida de las uniones adherentes [102].

1.6 RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNAS G 30 (GPR30)

El estrógeno es un esteroide crítico en la fisiología humana que ejerce su efecto tanto a nivel transcripcional como a nivel de señalización intracelular rápida a través de segundos mensajeros. Los efectos transcripcionales de los estrógenos están

mediados a través de receptores clásicos de esteroides nucleares, pero la descripción de la señalización de estrógenos dependiente de proteínas G y la localización en la membrana de sitios de unión a estrógenos con afinidades variables condujo a la especulación de un receptor de estrógeno transmembrana, posiblemente de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). A finales de la década de 1990, un supuesto GPCR fue clonado por cuatro grupos diferentes utilizando enfoques muy dispares [103-106]. El GPCR identificado en estos estudios mostró poca homología con otros GPCR, demostrándose que el RNAm de GPR30 se expresaba en numerosos tejidos, tal como hígado, pulmón, próstata, ovario y placenta [103, 104, 106]. Como no se conocía ningún ligando para este receptor, se etiquetó como un GPCR huérfano. En el año 2000 se identificó una posible función para este GPCR a partir de experimentos que demostraban la activación de ERK 1/2 por estrógenos, así como por antagonistas del receptor de estrógenos (RE), tales como ICI 182.780 y tamoxifeno. Ésta activación se demostró en líneas celulares de cáncer de mama que expresan GPR30, pero no en líneas celulares que carecen de GPR30. En éstas últimas líneas celulares, la señalización en respuesta al estrógeno podría restaurarse expresando GPR30 [107].

El GPR30, receptor de estrógeno alternativo, es una proteína de siete dominios transmembranales, que se identifica como una nueva proteína de unión a 17 β -estradiol (E2). Estructuralmente, es diferente de los receptores de estrógeno clásicos α y β [108]. GPR30 puede participar en eventos de señalización no genómicos inducidos por E2, incluida la estimulación de adenilato ciclasa [109]. Además, por el efecto de la transactivación de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF), GPR30 induce la movilización de reservas de calcio intracelular (Ca²⁺) y la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), así como las vías de señalización de la fosoinositol 3-quinasa (PI3K) [107, 110]. De igual manera, GPR30 puede facilitar el crecimiento tumoral, metástasis y resultados clínicos no favorables, ya que ha demostrado regular positivamente genes implicados en la proliferación celular (por ejemplo, las ciclinas) y supervivencia celular (por ejemplo, BCL-2), sugiriendo que su expresión y/o

activación podría jugar un papel importante en el proceso de carcinogénesis [111, 112].

2.0 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una de las principales causas de mortalidad por cáncer en las mujeres de todo el mundo. A pesar de los importantes avances en el tratamiento del cáncer, la mortalidad resulta a partir de la invasión local y/o metástasis a distancia y no del tumor en el sitio primario [113]. Por lo tanto, hay una fuerte demanda para entender los mecanismos celulares y moleculares que regulan la invasión tumoral y la metástasis con el fin de desarrollar mejores regímenes de tratamiento. La metástasis es un proceso multi-etapas que implica neo-vascularización, invasión del estroma por las células cancerosas, y la infiltración en espacios vasculares y linfáticos, la extravasación y el crecimiento en un sitio secundario [113, 114]. Se han reportado muchos factores celulares y moleculares para regular la metástasis tumoral. Sin embargo, un paso crítico de las células tumorales metastásicas es la capacidad de cruzar la MEC de los límites del tejido, un proceso que se puede lograr por la expresión de MMPs activas por las células cancerosas, que facilitan su migración [115].

La manipulación del citoesqueleto de actina conduce a la mejora de la motilidad celular, es uno de los mecanismos celulares dominantes que regulan la metástasis. Fascina es miembro de las proteínas del citoesqueleto de actina que agrupan los filamentos de actina en estructuras terciarias dentro de las estructuras celulares dinámicas como microespículas, fibras de estrés y pliegues de membrana, en consonancia con su abundante expresión en estos sitios. Recientemente, fascina ha sido bien descrita que está altamente sobre-expresada tanto a nivel de RNAm como proteína en diferentes tipos de cáncer humanos incluidos colon, mama, páncreas, pulmón, esófago, estómago, piel y ovario. La expresión de fascina correlaciona positivamente con tumores clínicamente agresivos y, como tal, ha recibido recientemente mucha atención tanto como un potencial marcador pronóstico y diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad metastásica [70]. Uno de los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama es la

obesidad, por tal motivo se analizará el papel de fascina estimulando con AL en células de cáncer mamario MDA-MB-231 que favorecerá el entendimiento del papel de esta proteína en los mecanismos de migración, invasión y metástasis.

3.0 HIPÓTESIS

La proteína fascina promueve el proceso de migración e invasión en presencia de AL en células de cáncer mamario MDA-MB-231.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar el papel de la proteína fascina en el proceso de migración e invasión inducida por AL en células cancerosas mamarias MDA-MB-231.

4.2 Objetivos Particulares

- Determinar si el AL modula los niveles de expresión de fascina en células MDA-MB-231 y MCF12A.
- Determinar si el AL induce la relocalización de fascina del citoplasma a los contactos focales en células MDA-MB-231 y MCF12A.
- Evaluar el papel de fascina en el proceso de migración inducido por AL.
- Estudiar el papel de fascina en la secreción de MMP-2 y MMP-9 así como en el proceso de invasión inducido por AL.
- Determinar la presencia de fascina en tejido tumoral de pacientes con cáncer mamario.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Las cajas de Petri utilizadas para el cultivo celular, fueron de Corning Inc. (New York, USA). El Anticuerpo anti-fascina, factor de crecimiento epidermal (EGF), siRNA de fascina, y sal sódica de ácido linoleico fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Faloidina conjugada a TRITC e hidrocortisona fueron obtenidas de Sigma-Aldrich Co (St, Louis, MO). Matrigel *BioCoat Matrigel Chamber* (BD Biosciences, Bedford, MA). Cámaras Boyden *BD®* con filtros de 8 μm . Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) de Bio-Rad (Bio-Rad, USA). El Anticuerpo anti-actina fue amablemente proporcionado por el José Manuel Hernández (Cinvestav-IPN).

Cultivo celular

La línea celular de cáncer mamario humano MDA-MB-231 fue cultivada en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 0.1 g/L de estreptomina, 0.06 g/L de penicilina G, en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 95% de aire a 37° C. La línea de células epiteliales mamarias no tumorigénica humana MCF12A fue crecida en una mezcla de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12 1:1) suplementado con 10% de SFB, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hidrocortisona, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF) recombinante y una mezcla de antibióticos en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 95% de aire a 37° C. Para propósitos experimentales, las células MDA-MB-231 y MCF12A fueron mantenidas por 24 h en DMEM sin SFB y suplementos (insulina, hidrocortisona y EGF) antes del tratamiento.

Estimulación celular con AL y extracción de proteínas totales

Una vez que las células MDA-MB-231 y MCF12A alcanzaron la confluencia deseada, se ayunaron durante 24 h en medio DMEM y DMEM/F12 (1:1) sin suero respectivamente. Posterior al ayuno, las células se lavaron con PBS 1X (K_2HPO_4 10 mM, NaCl 150 mM, con pH entre 7.2 a 7.4) y se estimularon con 90 mM de AL a

30 y 60 minutos. El estímulo se terminó al momento de aspirar el medio (medio condicionado) y las células fueron lisadas con 500 μ L de RIPA 1X (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, NaF 100 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, glicerol 10 %, Tritón X-100 1%, desoxicolato de sodio 1%, MgCl_2 1.5 mM, SDS 0.1% y PMSF 1 mM) para la obtención de extractos de proteínas totales. Los lisados fueron centrifugados a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante.

Inmunodetección (western blot)

La cuantificación de proteínas se realizó empleando la técnica de Bradford y se separaron por SDS-PAGE al 10% y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda (Bio-Rad) por 2h a 200 mA. La membrana obtenida se tiñó con rojo de Ponceau para corroborar la transferencia de proteínas. Para evitar interacciones inespecíficas la membrana fue bloqueada usando leche descremada al 5% en PBS 1X/Tween 20 al 0.1% por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente, a una concentración de 0.1 μ g/mL a 4°C durante toda la noche, seguido de tres lavados de 5 minutos con PBS 1X/Tween 20 al 0.1%. Para detectar la proteína de interés se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP), seguido de tres lavados de 5 minutos con PBS 1X/Tween 20 0.1%. Finalmente, las bandas fueron detectadas por autorradiografía utilizando el kit de quimioluminiscencia. Las imágenes fueron analizadas por densitometría mediante el programa ImageJ (NIH, USA) y el promedio del análisis se graficó con el programa GraphPad Prism versión 6.0.

Microscopía confocal

Las células MDA-MB231 y MCF12A fueron crecidas a 60-70 % de confluencia sobre cubreobjetos. Posteriormente las células fueron privadas de suero por 24 horas. Las células fueron estimuladas con AL por 30 y 60 minutos. Al término del estímulo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (p/v) por 20 minutos, permeabilizadas con 1 % (v/v) Tritón X-100 por 20 minutos y bloqueadas por 30

minutos con albumina de suero bovino al 3% (p/v). Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-fascina o anti-paxilina por 18-20 horas a 4°C. Las células fueron lavadas tres veces con PBS1X e incubadas con faloidina acoplada a TRITC para teñir filamentos de actina y con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC para fascina y anti-conejo acoplado a TRITC para paxilina por dos horas a 4°C. Fascina, paxilina y F-actina fueron analizados en un microscopio confocal marca Leica (Modelo TCS SP8; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Se tomaron secciones ópticas de 0.8-0.9 μm de grosor tomando los ejes xyz y xzy. Las imágenes fueron analizadas usando el programa Image J software (NIH, USA).

Silenciamiento de fascina

Las células MDA-MB-231 confluentes al 100% se ayunaron en medio DMEM sin suero y antibiótico por 8 h. Se prepararon dos soluciones, A y B, la solución A (15 μL de siRNA y 235 μL de medio sin suero y sin antibiótico) solución B (10 μL de lipofectamina y 240 μL de medio sin suero y sin antibiótico). La solución B se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se mezcló la solución A con B y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó el complejo formado por la solución A y B a cada caja, se añadió 500 μL de medio sin suero y sin antibiótico a un volumen final de 1 mL, mezclar y agitar. Se incubó a 37° C con 5% de CO₂ y 95% aire durante 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cambió el medio con el complejo de transfección a medio con 5% de SFB y antibiótico por 4 horas. Se realizaron los experimentos correspondientes utilizando medio sin suero.

Ensayo de migración mediante cierre de herida (scratch)

Los ensayos de cierre de herida fueron realizados en cajas para cultivo celular de 35 mm de diámetro y a 100% de confluencia. Las células MDA-MB-231 fueron mantenidas en supresión de suero por 24 horas y dentro de las dos últimas horas de ayuno, las células fueron tratadas con mitomicina C 12 μM con el fin de inhibir la proliferación celular. Posteriormente se realizó una rayadura a la monocapa de células con una punta de pipeta estéril de 200 μl y se lavaron con PBS 1X (3 veces)

para eliminar las células flotantes, se colocó el estímulo de AL 90mM por 48 horas. Posterior al tiempo de estímulo, se aspiró el medio y las células fueron fijadas con para-formaldehído al 4 % y teñidas con cristal violeta al 0.1% (p/v), ambos por 15 minutos. Finalmente, las células fueron fotografiadas al microscopio óptico y analizadas con el programa Image J (NIH, USA) y el promedio de la intensidad media de fluorescencia sobre la rayadura se graficó con el programa GraphPad Prism versión 6.0.

Ensayo de invasión (Cámaras de Boyden)

El ensayo de invasión celular fue realizado en cámaras de Boyden *BD®*, con filtros que poseen poros de 8 μm de diámetro, los pozos fueron recubiertos con Matrigel *BioCoat Matrigel Chamber* (BD Biosciences, Bedford, MA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, los cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron sometidos a supresión de suero por 24 horas. Posteriormente, las células fueron desprendidas con tripsina al 0.25% (p/v) y verseno al 0.02% (p/v), se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer para colocar 100,000 células en cada pozo, conjuntamente se colocaron las diferentes condiciones en la parte inferior de la cámara Boyden. A continuación, las células fueron incubadas por 48 horas en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células fueron fijadas con metanol frío durante 5 minutos para posteriormente remover, de la parte superior de la cámara, las células que no invadieron utilizando un hisopo de algodón. Una vez realizado este procedimiento, los insertos fueron teñidos con cristal violeta al 0.1% durante 10 minutos. Una vez teñidos los insertos, las membranas fueron solubilizadas con ácido acético al 10% y las células que invadieron se cuantificaron por absorbancia a 600 nm. Los resultados se graficaron como promedio de las absorbancias utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

Zimografía en gelatina

Los cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron privados de suero en medio de ayuno DMEM por 24 horas previas al estímulo con AL y diferentes condiciones. El medio condicionado fue colectado y concentrado por centrifugación en tubos Amicon (Merck Millipore) con un peso molecular nominal límite de (5,000 NMWL) por 1.5 horas a 2500 rpm a 4°C. La actividad proteolítica fue analizada en los sobrenadantes usando geles de poliacrilamida (8%) co-polimerizados con gelatina (1 mg/ml). Se mezclaron volúmenes constantes de sobrenadantes, con amortiguador de carga sin agentes reductores y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser resueltas por electroforesis a 4 °C. El gel se lavó 3 veces por 30 minutos con Tritón X-100 al 2.5% a temperatura ambiente y se incubó en buffer de activación de metaloproteinasas (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM CaCl₂) durante 48 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo, el gel se tiñó con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) y la actividad proteolítica fue detectada como una banda clara correspondiente a gelatina digerida, en un fondo azul de gelatina sin digerir.

Inclusión en parafina de tejido de mama

La inclusión en parafina de los tejidos utilizados en este estudio se llevó a cabo entre el año 2010 y 2011, en todos los casos se utilizó el mismo procedimiento. Primero se fijó el tejido, colocándolos en formol amortiguado al 10% y luego en alcohol y xilol. Posteriormente fueron embebidas en los bloques de parafina, a partir de los cuales se realizaron los cortes para realizar la inmunohistoquímica en este estudio. Previo a la realización de los cortes, los bloques se colocaron a 4°C durante 24 a 72 horas. Cada corte tuvo un espesor de 3µm y se colocó en un portaobjeto de vidrio cargado manualmente.

Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos embebidos en parafina se colocaron en la estufa a 58-60°C durante toda la noche para desparafinar. Al día siguiente se colocaron durante 20

min en xilol a 58-60° C para aclarar el tejido. Posteriormente se pasarán por diferentes soluciones sumergiendo treinta veces en cada una: xilol, alcohol-xilol, alcohol 96, 90, 80, 70, 60% para hidratar el tejido, finalmente se lavaron con agua. A continuación se colocaron en amortiguador de citratos pH 6 y se introdujeron en autoclave durante 15 minutos para exponer los antígenos. Se permeabilizó el tejido con PBS-Tritón 0.2% durante 5 min; se bloqueó la peroxidasa endógena con metanol/H₂O₂ por 30 minutos, se enjuagó con PBS 1x 5 veces. Se bloquearon uniones inespecíficas con leche al 5% en PBS 1X por 1 hora. Al finalizar se colocó el anticuerpo primario anti-fascina diluido en SFB al 3% y se incubó en cámara húmeda toda la noche a 4° C. Se lavó tres veces con PBS 1x-Tritón 0.2%. A continuación se colocó el anticuerpo secundario diluido en SFB 3% e incubó en cámara húmeda a 37°C 2 horas. Se lavó tres veces con PBS 1x-Tritón 0.2%. Se reveló con el cromógeno 3,3 diaminobencidina (DAB-chromogen + substrate buffer) diluido 1:10. Una vez revelado, se tiñó con hematoxilina de Harris por 60 segundos, se lavó con agua y se colocó en soluciones para deshidratar y aclarado del tejido (alcohol 60, 70, 80, 90, 96%, alcohol-xilol, xilol2 y xilol1), sumergiendo treinta veces en cada una. Se colocó una gota de resina sobre el tejido y sobre esta un cubreobjetos. Las laminillas se observaron en un microscopio óptico.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente usando ANOVA de una vía y prueba de Dunnett's para una comparación múltiple. Los resultados fueron expresados como la media ± D.S. de al menos tres experimentos independientes y la diferencia estadísticamente significativa fue considerada con una probabilidad de $P \leq 0.05$.

Población de estudio

Las 35 pacientes con cáncer de mama incluidas en el estudio fueron remitidas al Hospital Juárez de México durante los años 2010 y 2011, a la consulta de ginecología. Las muestras utilizadas para este trabajo, correspondientes a tejido tumoral mamario fueron colectadas durante 2010 y 2011, preservándolas en formol amortiguado al 10%, para incluirlas en parafina.

Consideraciones éticas

Este estudio se clasifica como investigación sin riesgo, ya que no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en este estudio. Este estudio se desarrolló con la aprobación del comité de ética del Hospital Juárez de México. Se utilizaron bloques de parafina del archivo de patología (tomadas a las pacientes con previo consentimiento informado) del Hospital Juárez de México y se revisaron las historias clínicas de las respectivas pacientes, con el fin de obtener información sobre las variables clínicas de estudio. Estos datos se manejaron confidencialmente y se utilizaron únicamente con fines investigativos.

Criterios de inclusión

- Mujeres confirmadas con cáncer de mama a diferentes estadios.
- Mujeres mexicanas mestizas con al menos tres generaciones de residencia en México.
- Mujeres mayores de 18 años de edad con presencia de tumor en glándula mamaria que amerita biopsia.
- Carta de consentimiento informado firmada.
- Estudio de mastografía.
- Reporte histopatológico.
- Sin haber recibido tratamiento previo.
- Sin evidencia clínica de otro tumor o antecedente de la misma.

Criterios de exclusión

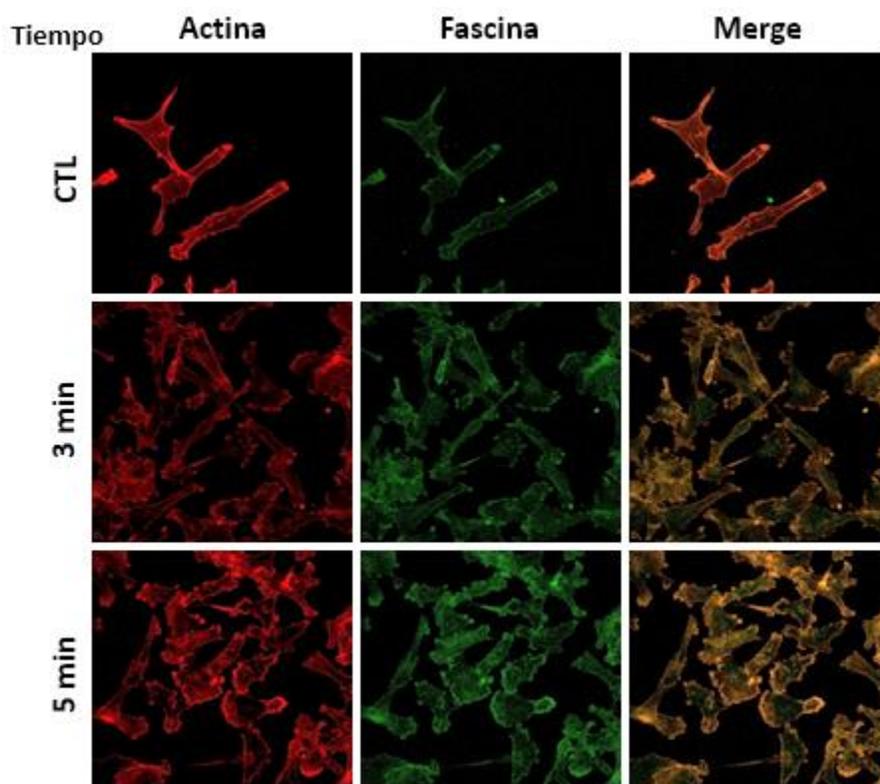
- Mujeres con enfermedad renal o cardíaca así como las que presenten ingesta de fármacos que afecten el metabolismo de lípidos.
- Embarazadas.
- Mujeres con tratamiento de esteroides y enfermedades inmunológicas.
- Pacientes a quienes no se les encontró biopsia incluida en bloque de parafina en el archivo de patología.

- Mujeres con expectativa de vida menor a tres meses, luego de ser diagnosticadas con cáncer de mama.

6.0 RESULTADOS

6.1 Expresión de fascina en líneas celulares

En primer lugar se determinó si el ácido linoleico induce relocalización de fascina hacia los bordes celulares y en que lapsos de tiempo se lleva a cabo. Células MDA-MB-231 fueron estimuladas con o sin AL 90 μ M durante 3, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los resultados obtenidos mostraron que el ácido linoleico induce incremento en el nivel de expresión de fascina así como relocalización de fascina a los bordes celulares, observándose un máximo a los 30, 45 y 60 minutos, por tal motivo se decidió utilizar tiempos de estimulación a 30 y 60 minutos para ensayos posteriores (Fig. 5).



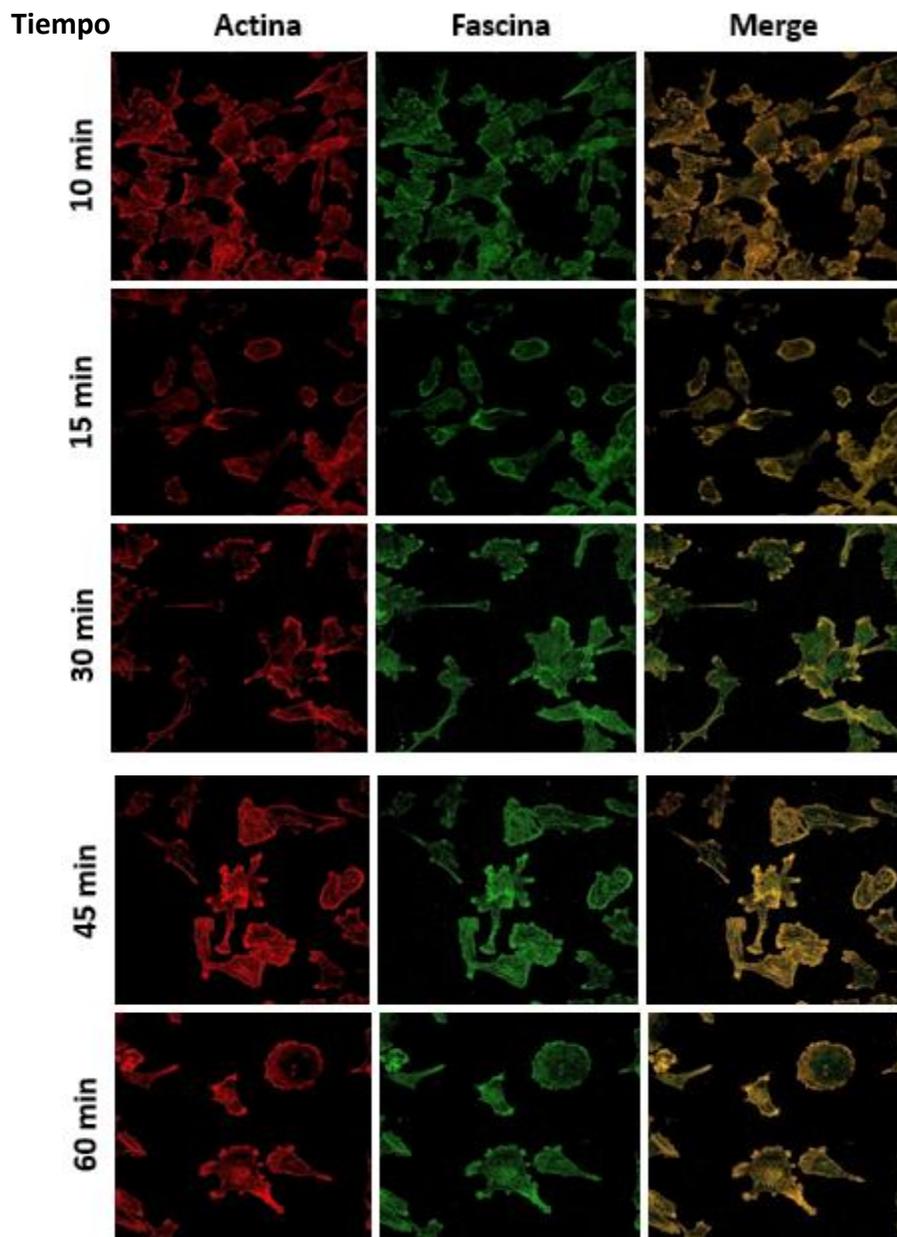
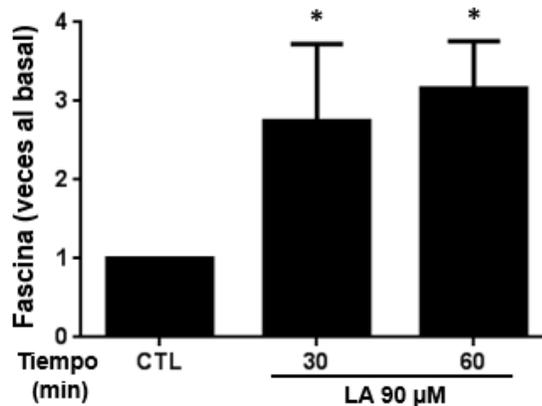
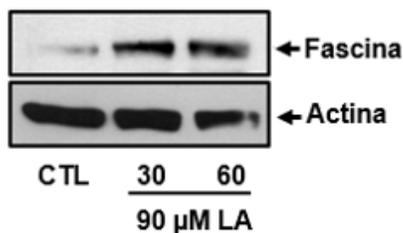


Figura 5. AL induce sobreexpresión y relocalización de fascina en los bordes celulares a 30, 45 y 60 minutos en células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 fueron cultivadas en cubreobjetos y estimuladas con AL durante 3, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos. Posterior al estímulo, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con anticuerpo anti-fascina y con TRITC. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

A continuación se determinó si el AL induce un incremento en los niveles de expresión de fascina en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y células epiteliales mamarias no tumorígenas MCF12A. Los cultivos de células MDA-MB-231 y MCF12A fueron estimuladas con o sin AL 90 μ M durante 30 y 60 minutos y lisadas. Los lisados celulares se analizaron por Western blot (WB) con anticuerpos anti-fascina y anti-actina como control de carga. Los resultados mostraron que las células MDA-MB-231 expresaron fascina y el tratamiento con AL durante 30 y 60 minutos indujo un aumento en los niveles de expresión de fascina (fig. 6a), mientras que las células MCF12A también expresaron fascina, y el tratamiento con AL solo indujo un ligero aumento en los niveles de expresión de fascina a los 60 min (fig. 6b). Los WB con anti-actina de las mismas membranas confirmó que se recuperaron cantidades similares de proteína después del tratamiento con AL.

A) MDA-MB-231



B) MCF12A

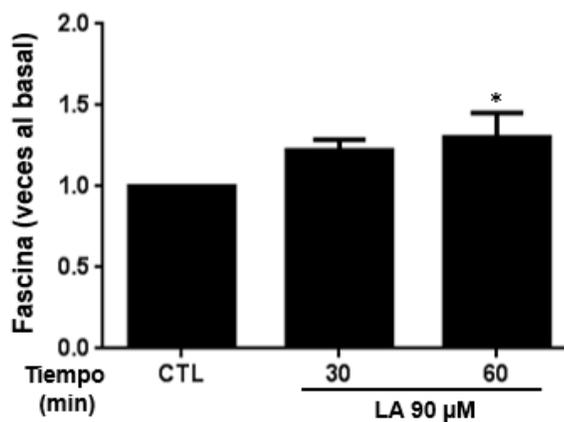
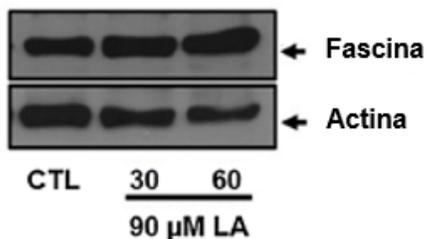
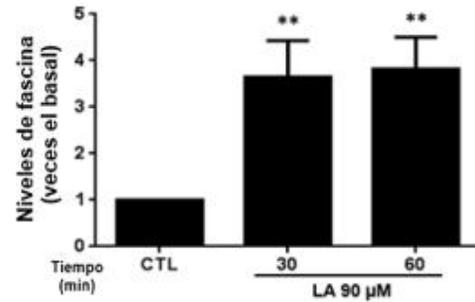
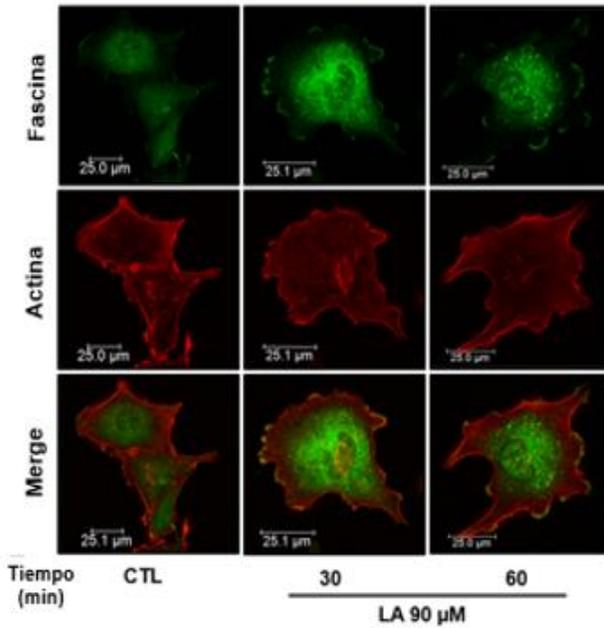


Figura 6. AL induce aumento en la expresión de fascina en células MDA-MB-231 y MCF12A. Células MDA-MB-231 y MCF12A fueron ayunadas por 24 horas y posteriormente tratadas con AL a 30 y 60 minutos. Las membranas fueron reveladas con anticuerpos anti-fascina y anti-actina, éste último como control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y las gráficas muestran el análisis estadístico de cada uno de los ensayos. El análisis densitométrico y estadístico se realizó utilizando los programas ImageJ y GraphPad Prism 6, respectivamente. * $p < 0.05$.

Para corroborar que el AL indujo un aumento en la expresión de fascina y para determinar si el tratamiento con AL indujo la relocalización de fascina, estudiamos la expresión de fascina y su localización mediante microscopía confocal. Las células MDA-MB-231 y MCF12A se cultivaron en cubreobjetos y se trataron con 90 μM de AL durante 30 y 60 minutos. Las células se fijaron y se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpo anti-fascina, mientras que la F-actina se tiñó con phalloidina conjugada a TRITC. Nuestros resultados mostraron que el AL indujo aumento en la expresión de fascina en citosol y la formación de filopodios y lamelipodios en células MDA-MB-231. Además, fascina se localizó principalmente en filopodios y lamelipodios (Fig. 7a). Por el contrario, el tratamiento con AL indujo un ligero aumento en la expresión de fascina en el citosol y la formación de microespículas en células MCF12A. Sin embargo, el AL no indujo la formación de filopodios y lamelipodios y fascina se localizó en los bordes de las células en microespículas (Fig. 7b).

A) MDA-MB-231



B) MCF12A

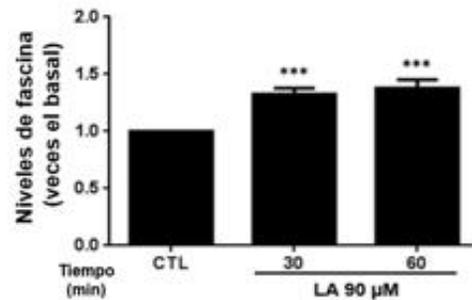
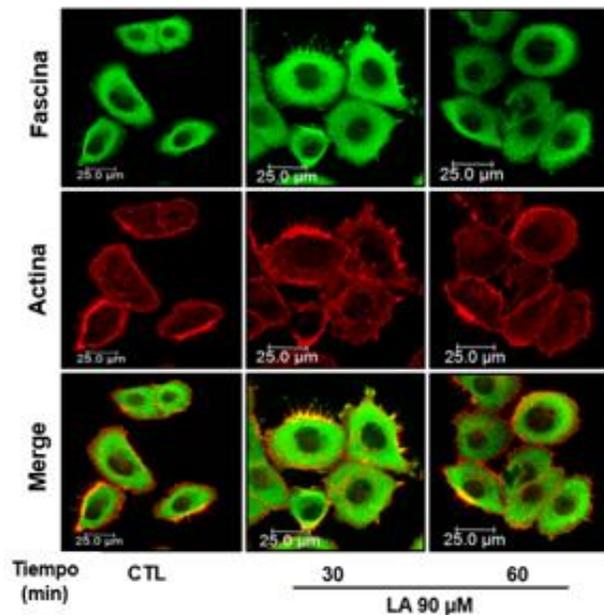


Figura 7. AL induce incremento en la expresión de fascina en células de cáncer mamario MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 y MCF12A fueron cultivadas en cubreobjetos y estimuladas con AL durante 30 y 60 minutos. Posterior al estímulo, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con anticuerpo anti-fascina y con TRITC. La imagen es representativa de tres experimentos independientes y la gráfica muestra el análisis

estadístico de la intensidad media de fluorescencia de esos tres experimentos que fueron realizados con los programas ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. **p<0.01, ***p < 0.001.

El oncogén Src es una proteína tirosina cinasa, se ha reportado que un alto nivel de expresión y actividad está relacionado con el desarrollo de cáncer así como con un fenotipo metastásico. Debido a lo anterior, determinamos si el oncogén Src participa en la relocalización de fascina hacia los bordes celulares inducida por AL. Las células MDA-MB-231 se cultivaron en cubreobjetos y se trataron con el inhibidor de Src, PP2 durante 60 minutos y con 90 μ M de AL durante 60 minutos. Las células se fijaron y se analizaron mediante inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-fascina, mientras que la F-actina se tiñó con phalloidina conjugada a TRITC. Los resultados obtenidos mostraron que el AL indujo incremento en la expresión de fascina en citoplasma y localización de la misma en filopodios y lamelipodios; en cambio, cuando utilizamos el inhibidor de Src, PP2, observamos que disminuye la expresión de fascina y no hay formación de filopodios y lamelipodios (Fig. 8). Basándonos en los resultados obtenidos, determinamos que el oncogén Src es necesario para la relocalización de fascina hacia los bordes celulares inducida por el AL.

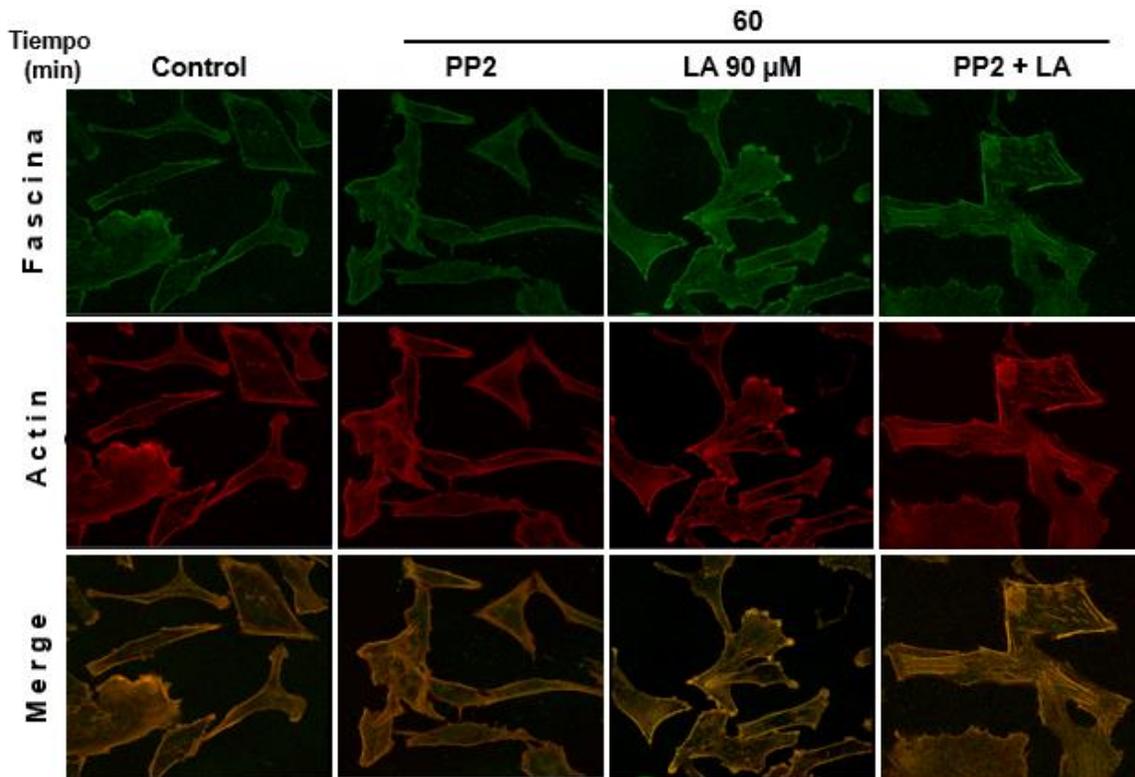


Figura 8. AL induce relocalización de fascina del citoplasma a los borde de las células MDA-MB-231 de una manera dependiente de Src. Células MDA-MB-231 fueron cultivadas en cubreobjetos y estimuladas con AL y el inhibidor de Src (PP2) durante 60 minutos. Posteriormente, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con anticuerpo anti-fascina y con TRITC. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

A continuación, determinamos si el AL induce aumento en la expresión de fascina en otra línea celular de cáncer mamario, la ZR-75. Las células ZR-75 se cultivaron en cubreobjetos y se trataron con 90 μ M de AL durante 30 y 60 minutos. Las células se fijaron y se analizaron mediante inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-fascina, mientras que la F-actina se tiñó con phalloidina conjugada a TRITC. Los resultados obtenidos mostraron que el AL indujo aumento en la expresión de fascina en el citosol y la formación de filopodios en células ZR-75. Posteriormente se analizó el incremento en la expresión de fascina en células ZR-75 mediante WB. Los cultivos de células ZR-75 fueron estimuladas con o sin AL 90 μ M durante 30 y 60 minutos y lisadas. Los lisados celulares se analizaron por WB con anticuerpos anti-fascina y anti-actina como control de carga. Los resultados mostraron que las

células ZR-75 expresan fascina y el tratamiento con AL durante 30 y 60 minutos indujo un aumento en los niveles de expresión de fascina, de manera similar a los observado en células MDA-MB-231 (Fig. 9).

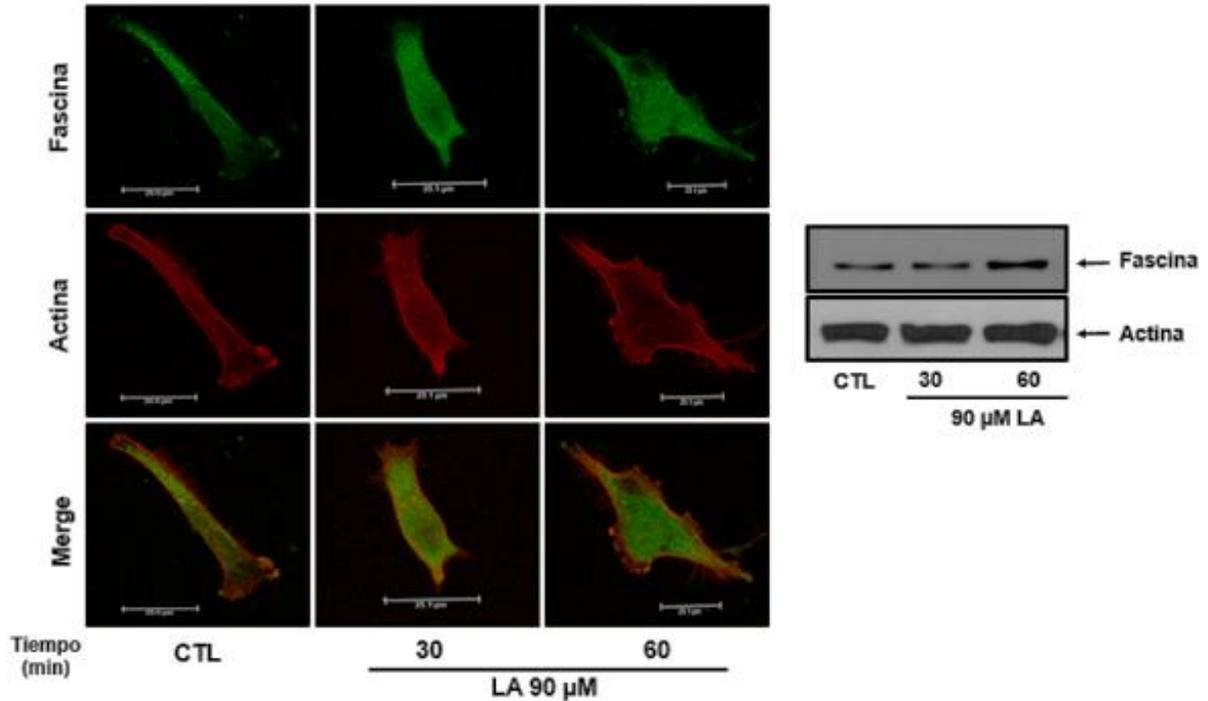


Figura 9. AL induce incremento en la expresión y relocalización de fascina del citoplasma a los borde de las células de cáncer mamario ZR-75. A. Células ZR-75 fueron cultivadas en cubreobjetos y estimuladas con AL durante 30 y 60 minutos. Posterior al estímulo, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con anticuerpo anti-fascina y con TRITC. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. B. Las células ZR-75 fueron ayunadas por 24 horas y posteriormente tratadas con AL a 30 y 60 minutos. Las membranas fueron reveladas con anticuerpos anti-fascina y anti-actina, éste último como control de carga. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Dado que hemos demostrado previamente que el AL indujo migración de células MDA-MB-231 [14], estudiamos el papel de fascina en la migración. Como se muestra en la Fig. 10, de acuerdo con nuestros hallazgos previos [14], el AL indujo migración de células MDA-MB-231 (Fig. 10).

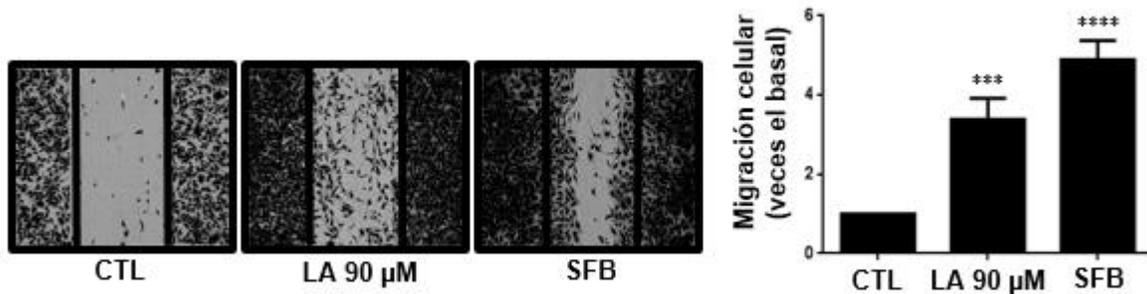


Figura 10. AL induce migración en células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 confluentes fueron ayunadas por 24 horas y tratadas con mitomicina C por 2 horas previas al término del ayuno. Posteriormente se realizó una rayadura en la monocapa celular con la punta estéril de una pipeta de 200 μ L. Las células fueron estimuladas con AL 90 μ M y se incubaron por 48 horas. Se incluyó un control de SFB. La imagen es representativa de tres experimentos independientes y la gráfica muestra el análisis estadístico de la intensidad media de fluorescencia que corresponde a las células presentes sobre la rayadura. El análisis se realizó con los programas ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

A continuación determinamos el papel de fascina en la migración inducida por AL. Primero, inhibimos la expresión de fascina utilizando siRNA contra fascina. Nuestros resultados mostraron una clara inhibición de la expresión de fascina (Fig. 11a). A continuación, los cultivos de células MDA-MB-231, en los que se inhibió la expresión de fascina, fueron sometidos a ensayos de cierra de herida y se estimularon con 90 μ M de AL durante 48 horas. Nuestros resultados mostraron que la migración inducida por AL requiere expresión de fascina en células MDA-MB-231 (Fig. 11b). El AL induce migración a través de una vía dependiente de fascina en células MDA-MB-231.

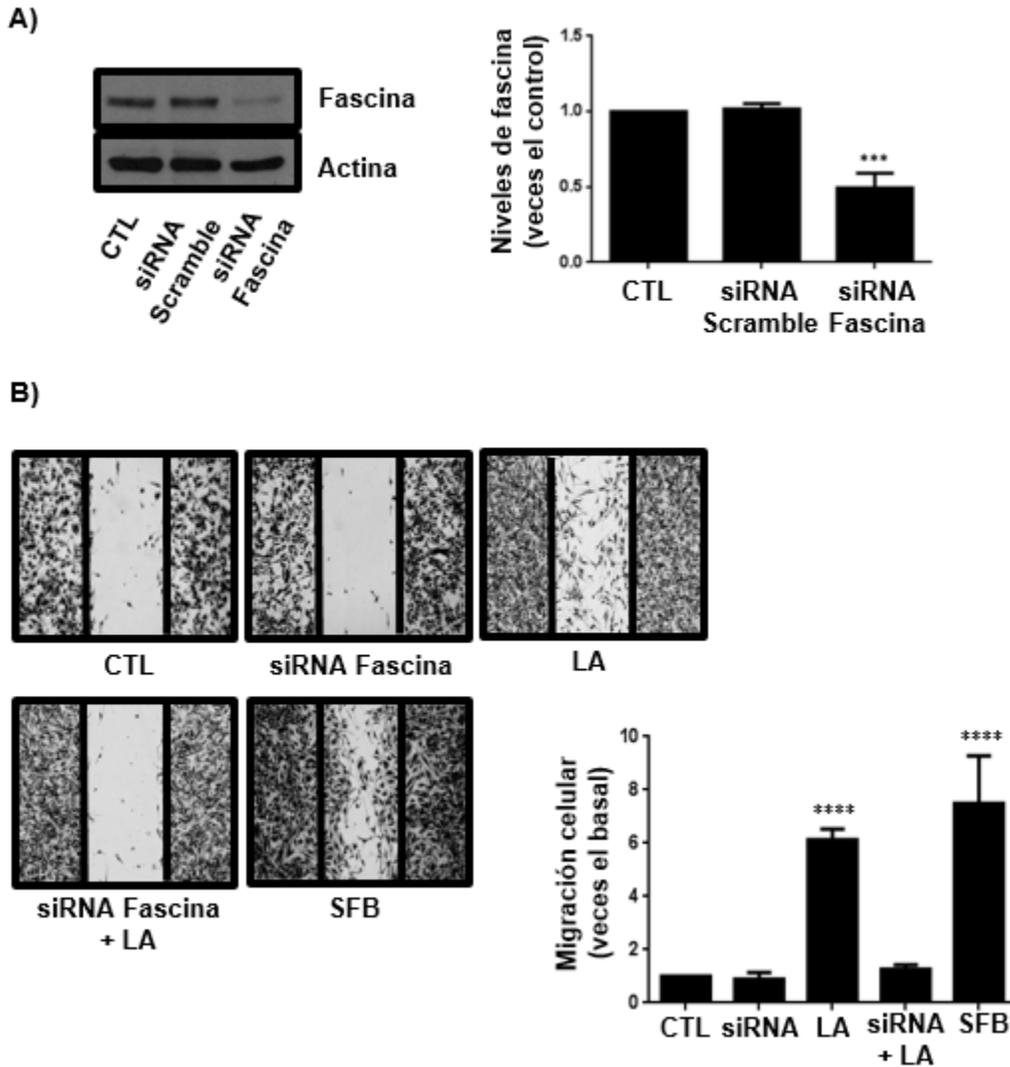


Figura 11. AL induce migración a través de una vía dependiente de fascina en células MDA-MB-231. A) se analizaron los lisados celulares de células MDA-MB-231 transfectadas con siRNA de fascina o siRNA scramble y fueron analizadas por WB con anticuerpos anti-fascina y anti-actina, este último como control de carga. B) cultivos confluentes de células MDA-MB-231 transfectadas con siRNA de fascina o siRNA scramble fueron tratadas con mitomicina C por 2 horas. Posteriormente se realizó una rayadura y tratadas con AL 90 μ M por 48 horas. Se incluyó un control de SFB. La imagen es representativa de tres experimentos independientes y la gráfica muestra el análisis estadístico de la intensidad media de fluorescencia que corresponde a las células presentes sobre la rayadura. El análisis se realizó con los programas ImageJ y GraphPad Prism versión 6.0. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

La migración celular requiere la formación de contactos focales, mientras que paxilina es una proteína localizada en estas estructuras [24]. Se determinó si el tratamiento con AL indujo una colocalización de fascina y paxilina. Las células MDA-MB-231 cultivadas en cubreobjetos fueron estimuladas con 90 μM de AL durante 60 minutos. Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-paxilina y anticuerpo anti-fascina. Como mencionamos anteriormente, el tratamiento con AL indujo aumento en la expresión de fascina, que colocalizó con paxilina, mientras que las células adoptaron una estructura tipo fibroblasto (Fig. 12). Nuestros hallazgos sugieren que el AL también indujo un aumento en la expresión de paxilina.

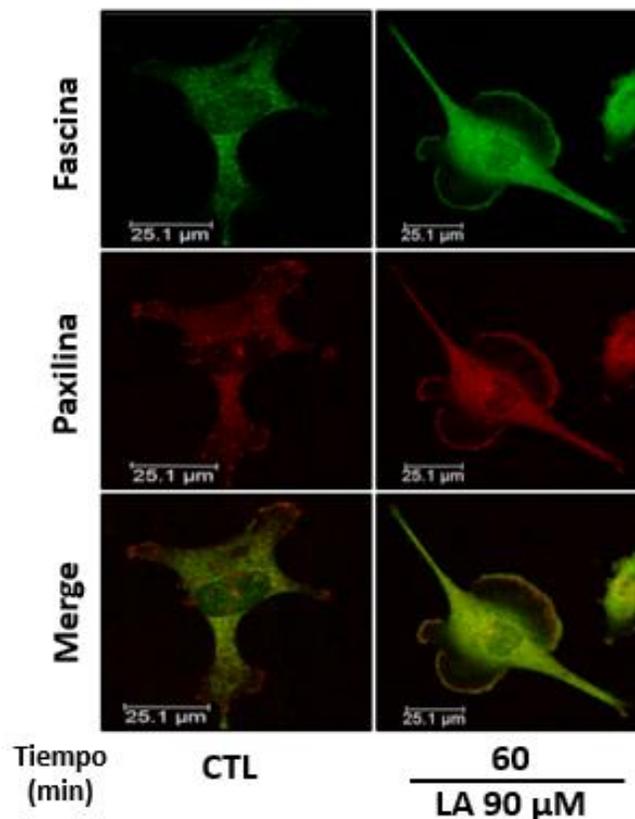


Figura 12. AL induce formación de contactos focales y colocalización de fascina y paxilina. Células MDA-MB-231 cultivadas en cubreobjetos se estimularon con 90 μM de AL durante 60 minutos y se fijaron. Las células se tiñeron con Ab anti-fascina y anti-paxilina. Fascina se muestra en verde y paxilina se muestra en rojo. La imagen se obtuvo por microscopía confocal y es representativa de tres experimentos independientes.

El AL induce invasión de células MDA-MB-231[11]. Determinamos el papel de fascina en la invasión inducida por el tratamiento con LA. Realizamos ensayos de invasión utilizando células MDA-MB-231, en los que la expresión de fascina fue inhibida utilizando siRNAs contra fascina, y tratada con 90 μ M de AL durante 48 horas. Como se ilustra en la Fig. 13, el AL indujo una clara invasión y dependía de la expresión de fascina en células MDA-MB-231.

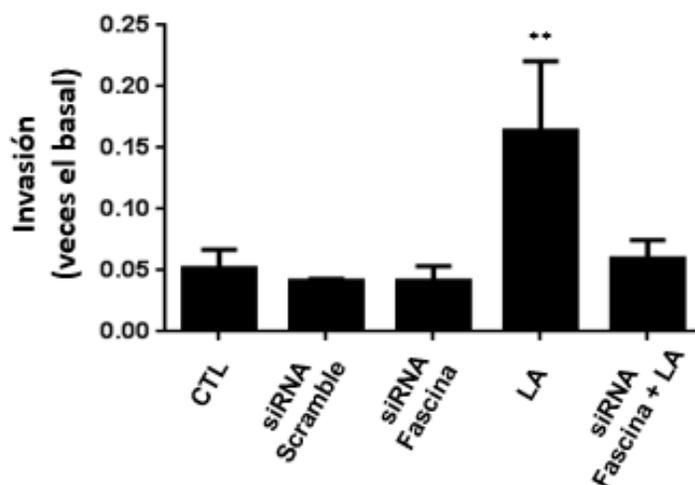


Figura 13. AL induce invasión a través de una vía dependiente de fascina en células MDA-MB-231. Los ensayos de invasión se realizaron usando células MDA-MB-231 transfectadas con siRNA de fascina o siRNA scramble y tratadas con 90 μ M de AL durante 48 horas. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes. ** $p < 0.01$.

A continuación, se estudió si el AL induce aumento en la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9) y el papel de fascina en la secreción de estas gelatinasas. Cultivos de células MDA-MB-231, en los que se inhibió la expresión de fascina, fueron estimulados con 90 μ M de AL por 48 horas, se obtuvo un medio condicionado y se lisaron las células. El medio condicionado fue analizado por zimografía de gelatina y los lisados celulares fueron sometidos a WB con anticuerpo anti-actina. Dado que el etanol (EtOH) y el PDB estimulan la secreción de MMP-2 y MMP-9, respectivamente [25,26], se incluyeron controles positivos para

la secreción de MMP-2 y MMP-9, que fueron preparados por el tratamiento de las células MDA-MB-231 con 100 ng/ml de PDB o 400 mg/dl de EtOH durante 24 horas. Nuestros resultados mostraron que el AL indujo un aumento en la secreción de MMP-9, pero no indujo un aumento en la secreción de MMP-2 en las células MDA-MB-231. Curiosamente, la inhibición de la expresión de fascina bloqueó el aumento de la secreción de MMP-9 (Fig. 14). El WB con el anticuerpo anti-actina de lisados celulares confirmó que un número similar de células estaba presente en las diferentes condiciones analizadas.

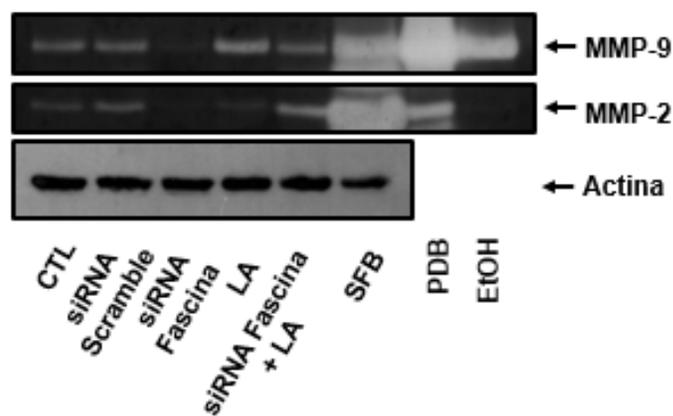


Figura 14. AL induce incremento en la secreción de MMP-9 de una manera dependiente de fascina en células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 transfectadas con siRNA de fascina o siRNA scramble se trataron con AL 90 μ M durante 48 h, se obtuvo medio acondicionado, se concentró y se analizó por zimografía. Las células fueron lisadas y analizadas por transferencia de WB con anticuerpo anti-actina como control de carga. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

6.2 Expresión de fascina en tejido tumoral

Por otro parte, determinamos la expresión de fascina en tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Se utilizaron bloques de parafina con tejido tumoral, se realizaron cortes histológicos de 3 μ m de grosor; la inmunohistoquímica fue realizada utilizando el sistema de detección de antígenos por ensayo inmunoenzimático, 3'3 diaminobencidina, para visualizar la localización del

complejo antígeno-anticuerpo-enzima. Las características clínico patológicas de las 34 pacientes con cáncer de mama incluidos en este estudio se describen en la tabla 1. Su edad osciló entre 37 y 80 años. Todas las muestras tenían diagnóstico de carcinoma ductal invasivo, 14 de ellas en estadio clínico II, 16 en estadio III y 4 en estadio IV.

Tabla 1. Características clínico-patológicas de pacientes con cáncer mamario.

Características de Pacientes	
Características	Pacientes [n (%)]
Edad (años)	
Media	52.8
Rango	37-80
Estadio de cáncer de mama	
II	14 (41)
III	16 (47)
IV	4 (12)
Tamaño de tumor primario	
T2	14 (41)
T3	11 (32)
T4	9 (27)
Estado de ganglios linfáticos	
Negativo	10 (29)
Positivo	24 (71)
Metástasis	
Negativo	30 (88)
Positivo	4 (12)
Estado de Her2/neu	
Negativo	22 (65)
Positivo	12 (35)
Estado del receptor de estrógenos	
Negativo	10 (29)
Positivo	24 (71)
Estado del receptor de progesterona	
Negativo	17 (50)
Positivo	17 (50)

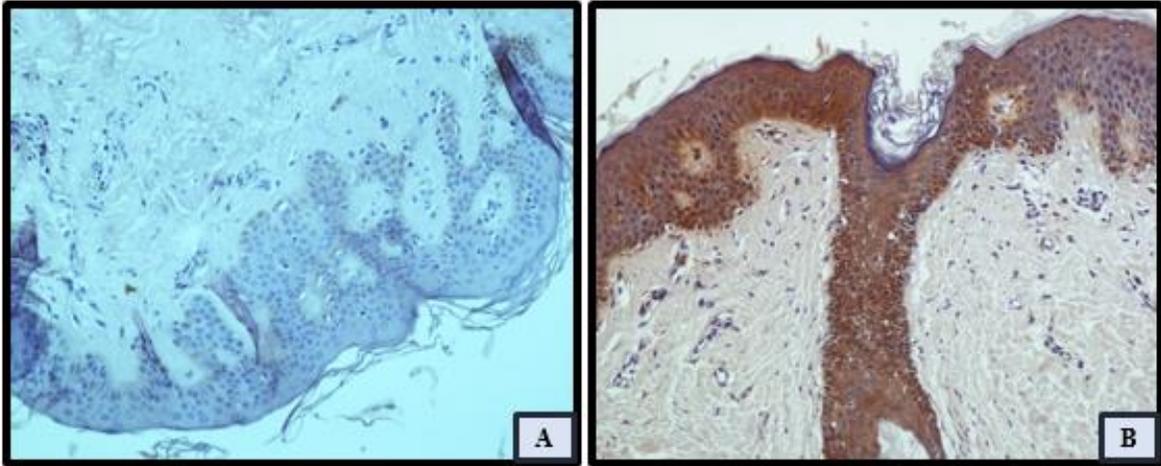


Figura 15. Control utilizado para la estandarización del protocolo de inmunohistoquímica para la determinación de expresión de fascina. La fotografía A corresponde al control negativo y B al control positivo. Fascina se evaluó en piel, donde su expresión se observó en citoplasma. Objetivo 20X.

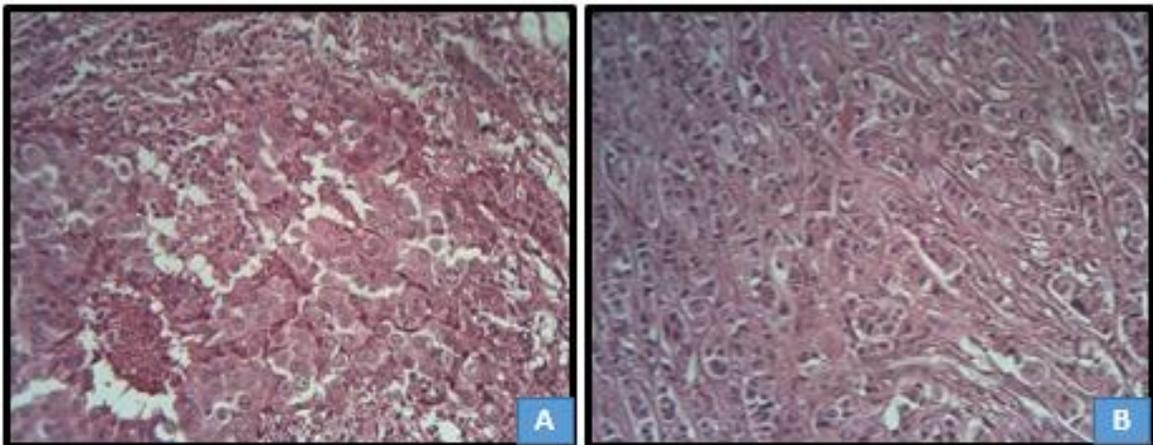


Figura 16. Tinción de hematoxilina y eosina. Fotografías tomadas a casos representativos de carcinoma ductal invasivo, que muestra las diferentes características estructurales y morfológicas de este tipo histológico. A. caso 13. B. Caso 25. Objetivo utilizado 10X.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las inmunistoquímicas para determinar la expresión de fascina. De las 34 muestras de tejido tumoral que componen el estudio, 2 (6%) expresaron fascina y 32 (94%) fueron fascina negativa. En los tejidos que hubo expresión de fascina, se observa en citoplasma (Fig. 17b).

De acuerdo al número de muestras que expresan fascina (2), nos fue imposible realizar algún tipo de asociación entre la expresión de fascina y las características clínico-patológicas.

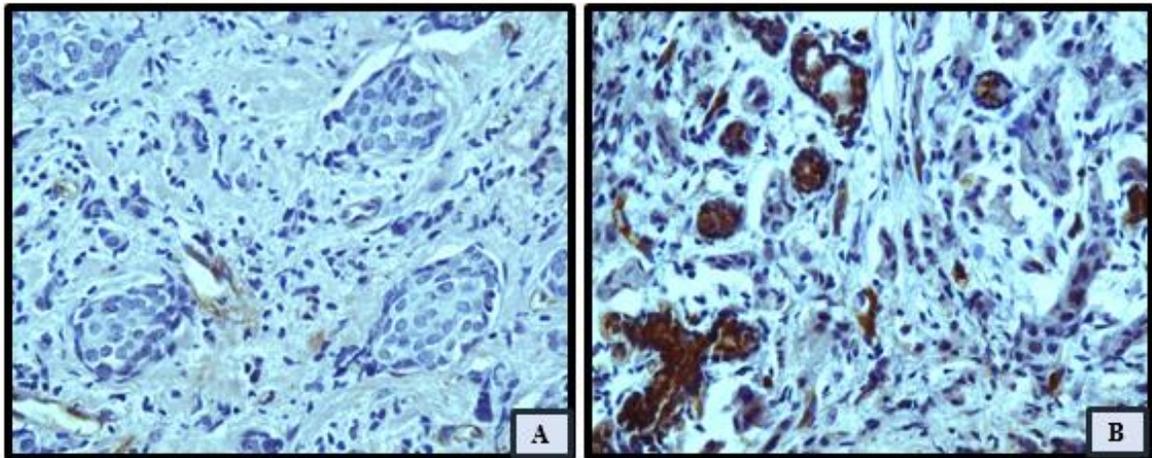


Figura 17. Técnica de inmunohistoquímica para determinar la expresión de fascina. Fotografías tomadas a casos representativos de carcinoma ductal invasivo. A. No hay expresión de fascina. B. Se observa expresión de fascina en citoplasma. Objetivo utilizado 20X.

6.3 Expresión de GPR30 en tejido tumoral

Debido a que no obtuvimos resultados favorables en la expresión de fascina en el tejido tumoral, decidimos determinar la expresión del GPR30, el cual recientemente se ha descrito como un mecanismo de señalización alternativo al RE, que puede activar señalización celular a través de estrógenos, así como por antagonistas del RE como es el tamoxifeno, que facilita el crecimiento tumoral, metástasis y sobrevivencia corta en el paciente [107, 116-118] .

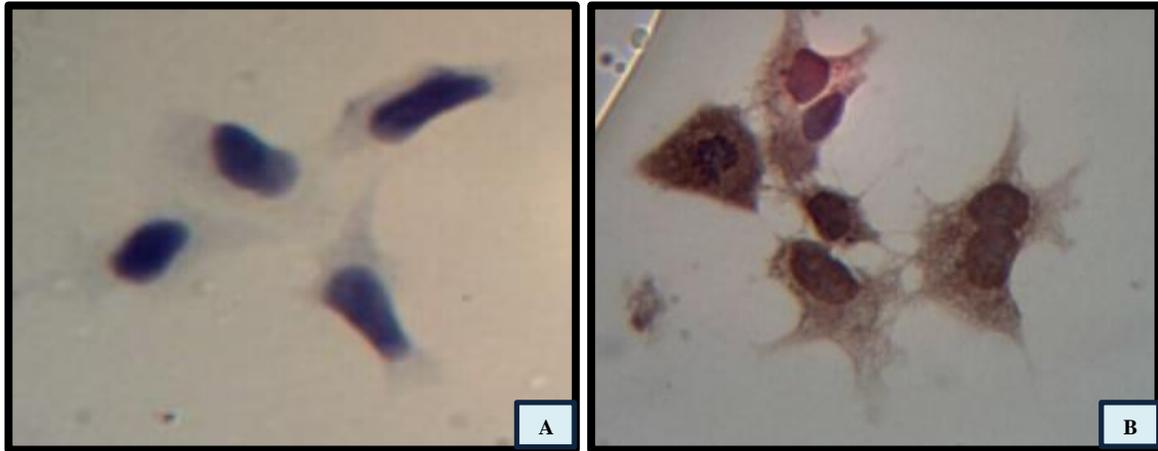


Figura 18. Control utilizado para la estandarización del protocolo de inmunohistoquímica para la determinación de expresión de GPR30. La fotografía A corresponde al control negativo y B al control positivo. GPR30 se evaluó en la línea celular de cáncer de mama MCF7, donde su expresión se observó en citoplasma y núcleo. Objetivo 40X.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las inmunistoquímicas para determinar la expresión de GPR30. De las 34 muestras de tejido tumoral que componen el estudio, 25 (74%) expresaron fascina y 9 (26%) fueron fascina negativa. En los tejidos que hubo expresión de GPR30, se observa en citoplasma y núcleo (Fig. 19b).

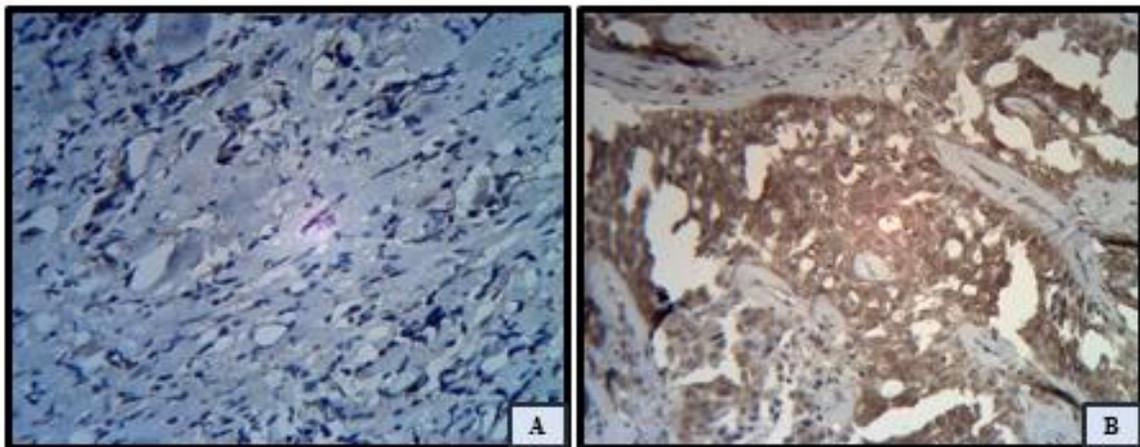


Figura 19. Técnica de inmunohistoquímica para determinar la expresión de GPR30. Fotografías tomadas a casos representativos de carcinoma ductal invasivo. A. No hay expresión de GPR30. B. Se observa expresión de GPR30 en citoplasma y núcleo. Objetivo utilizado 20X.

Con los resultados obtenidos de la expresión de GPR30, realizamos correlaciones con características clínico-patológicas. Como se observa en la tabla 2, la expresión de GPR30 no tiene asociación con el estadio, tamaño del tumor primario, metástasis a ganglios linfáticos, metástasis distante, expresión de HER2/neu y expresión del receptor de progesterona (RP). Existe asociación entre la expresión de GPR30 y el RE. De acuerdo a la expresión de GPR30 y RE, los casos fueron divididos en 4 grupos: RE+/GPR30- (10 casos, 29%), RE-/GPR30+ (0 casos, 0%), RE-/GPR30- (9 casos, 26%), mientras que casi la mitad de los casos fueron RE+/GPR30+ (15 casos, 45%).

Tabla 2. Asociación entre la expresión de GPR30 y características clínico-patológicas.

	N° de casos	Expresión de GPR30		Prueba de significancia	valor p
		Positivo (25)	Negativo (9)		
Estadio					
Temprano	14	9 (64)	5 (36)	Prueba exacta de Fisher	0.43
Avanzado	20	16 (80)	4 (20)		
Tamaño de tumor primario					
< 5 cm	14	10 (71)	4 (29)	$\chi^2 = 1.05$	1.0
> 5 cm	20	15 (75)	5 (25)		
Estado de ganglios linfáticos					
Negativo	10	6 (60)	4 (40)	Prueba exacta de Fisher	0.39
Positivo	24	19 (79)	5 (21)		
Metástasis					
Negativo	30	23 (77)	7 (23)	$\chi^2 = 1.29$	0.28
Positivo	4	2 (50)	2 (50)		
Estado de Her2/neu					
Negativo	22	16 (73)	6 (27)	$\chi^2 = 0.02$	0.89
Positivo	12	9 (75)	3 (25)		
Estado del receptor de estrógenos					
Negativo	10	10 (100)	0 (0)	Prueba exacta de Fisher	0.03*
Positivo	24	15 (63)	9 (37)		
Estado del receptor de progesterona					
Negativo	17	14 (82)	3 (18)	$\chi^2 = 1.36$	0.24
Positivo	17	11 (65)	6 (35)		

χ^2 = Prueba de Chi cuadrada

* Estadísticamente significativo

7.0 DISCUSIÓN

Los estudios epidemiológicos demuestran que un patrón dietético caracterizado por una gran cantidad de grasas, incluidos los AGPI ω -6, aumenta el riesgo de cáncer de mama. Particularmente, el AL es el principal ácido graso en las dietas occidentales con una ingesta de 15-20 g/día/persona y una concentración plasmática de $\sim 275 \mu\text{M}$ [119-122]. Estudios previos en nuestro laboratorio, demostraron que el AL induce migración e invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 [123, 124]. Sin embargo, el papel del AL en la expresión y organización de fascina/actina, así como su papel en migración e invasión mediada por el tratamiento con AL en células MDA-MB-231, aún no se ha estudiado.

A la fecha, no se ha reportado la expresión de fascina en el epitelio adulto normal, pero se expresa en la capa basal de la epidermis. Por el contrario, la regulación al alza de la expresión de fascina se ha demostrado en carcinomas humanos metastásicos de diferentes sitios [125]. Particularmente, los niveles elevados de fascina correlacionan con fenotipos clínicamente agresivos, mal pronóstico y un periodo más corto sin la enfermedad en pacientes con cáncer de mama [126]. En este trabajo demostramos que el AL induce un aumento de la expresión de fascina a los 30 y 60 minutos de tratamiento en las células MDA-MB-231. De acuerdo con nuestros hallazgos, Snyder y colaboradores (2014), reportaron que las células MDA-MB-231 expresan niveles basales de fascina y el tratamiento con IL-6 y TNF- α induce aumento de los transcritos de fascina a los 30 minutos de tratamiento [127]. Además, demostramos que las células epiteliales mamarias no tumorales MCF12A expresan niveles basales de fascina y el tratamiento con AL solo induce un ligero aumento de la expresión de fascina a los 60 minutos de tratamiento. Nuestros hallazgos sugieren fuertemente que las células epiteliales mamarias también expresan fascina y, por lo tanto, se necesitan estudios adicionales para determinar si fascina es o no expresado en las células epiteliales mamarias adultas.

Fascina contribuye a la organización de estructuras basadas en actina, que incluyen protrusiones de células corticales y haces de microfilamentos citoplásmicos, que participan en la migración, las interacciones celulares, la arquitectura y los

movimientos intracelulares [46]. Además, fascina está en equilibrio entre el citosol y el citoesqueleto, y su función está modulada por una variedad de ligandos que incluyen componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento y citocinas [55, 57]. Nuestros resultados demuestran que el AL induce la formación de filopodios y lamelipodios y la localización de fascina con estas estructuras en células MDA-MB-231. Particularmente, fascina se localiza principalmente con lamelipodios. En contraste, en células MCF12A, el AL simplemente induce la formación de microespículas y la localización de fascina con estas estructuras; sin embargo, no induce la formación de lamelipodios y filopodios en células epiteliales mamarias no tumorales MCF12A. Proponemos que fascina contribuye a la formación de estructuras específicas de actina/fascina en células mamarias humanas y que son específicas de cáncer de mama y las células epiteliales mamarias no tumorales. Apoyando nuestra propuesta, Shibue y colaboradores (2012) y Wang y colaboradores (2002), demostraron que los filopodios son ricos en células tumorales metastásicas y su número se correlaciona con su invasividad, mientras que las estructuras de tipo filopodio son críticas para la colonización de tejidos u órganos secundarios para las células tumorales metastásicas [128, 129]

El proceso de invasión/metástasis involucra desprendimiento de células, migración/invasión, intravasación, supervivencia en la circulación, extravasación y proliferación en los tejidos distales [113]. En el cáncer de mama, la expresión de fascina se correlaciona inversamente con la presencia de receptores de estrógeno y progesterona, pero no está relacionada con la sobreexpresión de HER-2 [126, 130]. Anteriormente demostramos que el AL induce migración e invasión de células MDA-MB-231, pero no puede inducir migración de células MCF12A. En este trabajo demostramos que la migración y la invasión inducida por el AL requieren expresión de fascina en células MDA-MB-231. Proponemos que el AL desempeña un papel importante en la migración y la invasión del cáncer de mama a través de la expresión de fascina. Apoyando nuestra propuesta, Al-Alwan y colaboradores han demostrado que la expresión de fascina promueve la regulación negativa del supresor 1 de metástasis de cáncer de mama (BRMS1) y la regulación positiva de proteínas

involucradas en metástasis incluyendo el activador de plasminógeno tipo uroquinasa, MMP-2 y MMP-9 en células MDAMB-231 [131].

Las MMPs son una familia de endopeptidasas que colectivamente pueden degradar todos los componentes de la MEC y están implicadas en la progresión tumoral porque promueven la angiogénesis, el crecimiento de células tumorales y la degradación de la MB y matrices intersticiales [95, 132]. Sin embargo, las MMPs son sintetizadas y secretadas como zimógenos que requieren activación para convertirse en proteolíticamente activos, y por lo tanto la activación es un paso crítico en la regulación de la actividad proteolítica dependiente de MMPs [133, 134]. Particularmente, MMP-2 y MMP-9 están altamente expresados en tumores malignos, incluido el cáncer de mama, y están asociados con invasión y metástasis porque pueden degradar el colágeno tipo IV, que es el componente principal de la MB [134, 135]. En este trabajo demostramos que el AL induce la secreción de MMP-9 y depende de la expresión de fascina en células MDA-MB-231. Nuestros resultados demuestran un nuevo papel de fascina en la secreción de MMP-9 inducida por el AL y apoyan un papel importante de fascina en la migración y la invasión de células de cáncer de mama.

Curiosamente, MMP-2 y MMP-9 aparecen en el sobrenadante mucho antes de que sea detectado un aumento en el RNAm de gelatinasas mediante RT-PCR en células Jurkat T y T primarias transfectadas con cDNA de FAK tipo silvestre. Además, el bloqueo de la transcripción con actinomicina D no inhibe el aumento de la secreción de gelatinasas, mientras que el bloqueo de la secreción de proteínas con monensina y brefeldina A reduce la producción de gelatinasas en el sobrenadante [136]. Además, en nuestro laboratorio, Cortes-Reynosa demostró que el tratamiento de células de cáncer de mama MCF7 con colágeno tipo IV induce un aumento de la secreción de MMP-9, pero no induce un aumento del RNAm de MMP-9 a las 30 horas de tratamiento [137]. De acuerdo a lo anterior, proponemos que el tratamiento con AL durante 48 horas induce la secreción de MMP-9, pero no induce un aumento de RNAm de MMP-9 en células MDA-MB-231.

Fascina se localiza en la adhesión focal y es considerada como una proteína del adhesoma [138, 139]. Además, fascina también se localiza en adhesiones positivas para paxilina, mientras que el número de adhesiones maduras es mayor en células carentes de fascina [140]. En este trabajo demostramos que las células MDA-MB-231 no tratadas no muestran colocalización de fascina con paxilina. Sin embargo, el tratamiento con AL induce un aumento de la expresión de fascina, que se acompaña con su colocalización con paxilina. Dado que la reorganización del citoesqueleto de actina y las adhesiones focales son necesarias para la migración, invasión y metástasis, fascina y paxilina desempeñan un papel importante en la formación de estas estructuras, proponemos que la colocalización de fascina y paxilina inducida por el AL es necesaria para el proceso de migración e invasión en células de cáncer de mama. Apoyando nuestra propuesta, Omran y Al Sheeha (2015) reportaron que fascina y paxilina son expresadas en el carcinoma infiltrante de conductos y se correlacionan con factores de mal pronóstico [141].

Por otra parte, la expresión de fascina en tejido tumoral fue baja (2/34, 6%), lo cual difiere con los resultados obtenidos con los ensayos *in vitro* antes mencionados. Respecto a esto, proponemos que debido a que fascina está relacionada con procesos de migración e invasión, y los tejidos tumorales utilizados en este trabajo corresponden a tumores primarios, donde las células no presentan un fenotipo metastásico pudiera ser la causa por la que obtuvimos baja expresión de fascina. En relación a estos resultados, se ha reportado que la expresión de fascina en dos grupos de estudio con cáncer de mama es cerca del 20%, aunque la cantidad de muestras utilizadas en su estudio son superiores a las utilizadas en este trabajo [142, 143].

En nuestro estudio, la asociación entre la expresión de GPR30 y diferentes características clínico-patológicas reveló relación significativa entre la positividad de GPR30 y el RE. De acuerdo con estos resultados, Aiad y colaboradores (2014) y Filardo y colaboradores (2006) reportan que la asociación de la expresión de GPR30 y ciertas características clínico-patológicas (entre ellas RE), pueden contribuir con la progresión del carcinoma de mama [118, 144].

8.0 CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que fascina es requerida para la migración e invasión inducida por el AL en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

1. El AL induce aumento en los niveles de expresión y relocalización de fascina en células MDA-MB-231.
2. El AL induce migración de una manera dependiente de fascina en células MDA-MB-231.
3. El AL induce la formación de contactos focales y aumenta la expresión de fascina y paxilina.
4. El AL induce invasión de una manera dependiente de fascina en células MDA-MB-231.
5. No se observa alta expresión de fascina en tejido tumoral en comparación con los resultados obtenidos en la línea celular MDA-MB-231.

9.0 REFERENCIAS

1. WHO, *Cancer: fact sheet number 297*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, 2014. (accessed Mar 24, 2014).
2. McGee, S.F., et al., *Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression*. EMBO Rep, 2006. **7**(11): p. 1084-8.
3. Hansen, R.K. and M.J. Bissell, *Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones*. Endocr Relat Cancer, 2000. **7**(2): p. 95-113.
4. Petersen, O.W. and B. van Deurs, *Growth factor control of myoepithelial-cell differentiation in cultures of human mammary gland*. Differentiation, 1988. **39**(3): p. 197-215.
5. Beckmann, M.W., et al., *Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity*. J Mol Med (Berl), 1997. **75**(6): p. 429-39.
6. McSherry, E.A., et al., *Molecular basis of invasion in breast cancer*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(24): p. 3201-18.
7. Chavarri-Guerra, Y., et al., *Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system*. Lancet Oncol, 2012. **13**(8): p. e335-43.
8. WHO, *Breast Cancer: prevention and control*. <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html>, 2014. (accessed Mar 24, 2014).
9. International Agency for Research on Cancer, W., *GLOBOCAN 2012: cancer incidence and mortality worldwide in 2012*. <http://www.globocan.iarc.fr/>, 2014. (accessed Mar 24, 2014).
10. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
11. Knaul, F.M., et al., *Breast cancer in Mexico: a pressing priority*. Reprod Health Matters, 2008. **16**(32): p. 113-23.
12. Washbrook, E., *Risk factors and epidemiology of breast cancer* Women's Health Med, 2006. **3**(1): p. 8-14.
13. Key, T.J., P.K. Verkasalo, and E. Banks, *Epidemiology of breast cancer*. Lancet Oncol, 2001. **2**(3): p. 133-40.
14. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*. Lancet, 1997. **350**(9084): p. 1047-59.
15. Hunter, D.J., et al., *Non-dietary factors as risk factors for breast cancer, and as effect modifiers of the association of fat intake and risk of breast cancer*. Cancer Causes Control, 1997. **8**(1): p. 49-56.
16. Kelsey, J.L. and L. Bernstein, *Epidemiology and prevention of breast cancer*. Annu Rev Public Health, 1996. **17**: p. 47-67.

17. Evans, D.G. and A. Howell, *Breast cancer risk-assessment models*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(5): p. 213.
18. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 187-95.
19. Lipworth, L., L.R. Bailey, and D. Trichopoulos, *History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(4): p. 302-12.
20. Venkitaraman, A.R., *Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2*. Cell, 2002. **108**(2): p. 171-82.
21. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease*. Lancet, 2001. **358**(9291): p. 1389-99.
22. Magnusson, C., et al., *Body size in different periods of life and breast cancer risk in post-menopausal women*. Int J Cancer, 1998. **76**(1): p. 29-34.
23. Bergstrom, A., et al., *Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe*. Int J Cancer, 2001. **91**(3): p. 421-30.
24. Singletary, K.W. and S.M. Gapstur, *Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms*. JAMA, 2001. **286**(17): p. 2143-51.
25. Hamajima, N., et al., *Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. Br J Cancer, 2002. **87**(11): p. 1234-45.
26. Willett, W.C., et al., *Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer*. N Engl J Med, 1987. **316**(19): p. 1174-80.
27. Terry, P., et al., *A prospective study of major dietary patterns and the risk of breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(12): p. 1281-5.
28. Bray, F., P. McCarron, and D.M. Parkin, *The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(6): p. 229-39.
29. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies*. Lancet, 1996. **347**(9017): p. 1713-27.
30. Beral, V., *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 419-27.
31. Vassilopoulou-Sellin, R., *Breast cancer and hormonal replacement therapy*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **997**: p. 341-50.
32. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(3): p. 321-33.

33. Olsson, H.L., C. Ingvar, and A. Bladstrom, *Hormone replacement therapy containing progestins and given continuously increases breast carcinoma risk in Sweden*. *Cancer*, 2003. **97**(6): p. 1387-92.
34. Wang, W., et al., *Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors*. *Cancer Res*, 2004. **64**(23): p. 8585-94.
35. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(5): p. 362-74.
36. Webb, D.J., J.T. Parsons, and A.F. Horwitz, *Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(4): p. E97-100.
37. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. *Cell*, 1995. **81**(1): p. 53-62.
38. Jiang, P., A. Enomoto, and M. Takahashi, *Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton*. *Cancer Lett*, 2009. **284**(2): p. 122-30.
39. Broussard, J.A., D.J. Webb, and I. Kaverina, *Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(1): p. 85-90.
40. Frame, M.C., et al., *v-Src's hold over actin and cell adhesions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(4): p. 233-45.
41. Franco, S.J. and A. Huttenlocher, *Regulating cell migration: calpains make the cut*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 17): p. 3829-38.
42. Lorenz, M., et al., *Imaging sites of N-wasp activity in lamellipodia and invadopodia of carcinoma cells*. *Curr Biol*, 2004. **14**(8): p. 697-703.
43. Bryan, J. and R.E. Kane, *Separation and interaction of the major components of sea urchin actin gel*. *J Mol Biol*, 1978. **125**(2): p. 207-24.
44. Otto, J.J., R.E. Kane, and J. Bryan, *Formation of filopodia in coelomocytes: localization of fascin, a 58,000 dalton actin cross-linking protein*. *Cell*, 1979. **17**(2): p. 285-93.
45. Sanchez Alvarado, A., et al., *The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration*. *Development*, 2002. **129**(24): p. 5659-65.
46. Kureishy, N., et al., *Fascin, and their roles in cell structure and function*. *Bioessays*, 2002. **24**(4): p. 350-61.
47. De Arcangelis, A., E. Georges-Labouesse, and J.C. Adams, *Expression of fascin-1, the gene encoding the actin-bundling protein fascin-1, during mouse embryogenesis*. *Gene Expr Patterns*, 2004. **4**(6): p. 637-43.
48. Wada, Y., et al., *Mutation of human retinal fascin gene (FSCN2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. **42**(10): p. 2395-400.
49. Tubb, B., et al., *Testis fascin (FSCN3): a novel paralog of the actin-bundling protein fascin expressed specifically in the elongate spermatid head*. *Exp Cell Res*, 2002. **275**(1): p. 92-109.
50. Adams, J.C., *Roles of fascin in cell adhesion and motility*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(5): p. 590-6.

51. Tubb, B.E., et al., *Characterization of human retinal fascin gene (FSCN2) at 17q25: close physical linkage of fascin and cytoplasmic actin genes*. Genomics, 2000. **65**(2): p. 146-56.
52. Sedeh, R.S., et al., *Structure, evolutionary conservation, and conformational dynamics of Homo sapiens fascin-1, an F-actin crosslinking protein*. J Mol Biol, 2010. **400**(3): p. 589-604.
53. Chen, L., et al., *Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 1062-6.
54. Ono, S., et al., *Identification of an actin binding region and a protein kinase C phosphorylation site on human fascin*. J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2527-33.
55. Adams, J.C., et al., *Cell-matrix adhesions differentially regulate fascin phosphorylation*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(12): p. 4177-90.
56. Anilkumar, N., et al., *Interaction of fascin and protein kinase Calpha: a novel intersection in cell adhesion and motility*. EMBO J, 2003. **22**(20): p. 5390-402.
57. Shonukan, O., et al., *Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin*. Oncogene, 2003. **22**(23): p. 3616-23.
58. Zhang, F.R., et al., *Fascin expression in human embryonic, fetal, and normal adult tissue*. J Histochem Cytochem, 2008. **56**(2): p. 193-9.
59. Guvakova, M.A., D. Boettiger, and J.C. Adams, *Induction of fascin spikes in breast cancer cells by activation of the insulin-like growth factor-I receptor*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(6): p. 685-98.
60. Li, R., et al., *IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1*. Oncol Rep, 2010. **23**(6): p. 1553-9.
61. Onodera, M., et al., *Fascin is involved in tumor necrosis factor-alpha-dependent production of MMP9 in cholangiocarcinoma*. Lab Invest, 2009. **89**(11): p. 1261-74.
62. Quintavalle, M., et al., *MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro*. J Cell Biol, 2010. **189**(1): p. 13-22.
63. Chiyomaru, T., et al., *miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer*. Br J Cancer, 2010. **102**(5): p. 883-91.
64. Kano, M., et al., *miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2804-14.
65. Yamakita, Y., et al., *Phosphorylation of human fascin inhibits its actin binding and bundling activities*. J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12632-8.
66. Adams, J.C. and M.A. Schwartz, *Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42*. J Cell Biol, 2000. **150**(4): p. 807-22.
67. Parsons, M. and J.C. Adams, *Rac regulates the interaction of fascin with protein kinase C in cell migration*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 17): p. 2805-13.
68. Hashimoto, Y., M. Parsons, and J.C. Adams, *Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(11): p. 4591-602.

69. Li, A., et al., *The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion*. *Curr Biol*, 2010. **20**(4): p. 339-45.
70. Hashimoto, Y., M. Skacel, and J.C. Adams, *Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: prospects for a novel biomarker?* *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(9): p. 1787-804.
71. Vignjevic, D., et al., *Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(14): p. 6844-53.
72. Hardy, S., et al., *Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(34): p. 31861-70.
73. McArthur, M.J., et al., *Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids*. *J Lipid Res*, 1999. **40**(8): p. 1371-83.
74. Howe, G.R., et al., *Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies*. *J Natl Cancer Inst*, 1990. **82**(7): p. 561-9.
75. Freedman, L.S., et al., *A comparison of two dietary instruments for evaluating the fat-breast cancer relationship*. *Int J Epidemiol*, 2006. **35**(4): p. 1011-21.
76. Fay, M.P., et al., *Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review*. *Cancer Res*, 1997. **57**(18): p. 3979-88.
77. Jump, D.B. and S.D. Clarke, *Regulation of gene expression by dietary fat*. *Annu Rev Nutr*, 1999. **19**: p. 63-90.
78. Chalbos, D., et al., *Progestin-induced fatty acid synthetase in human mammary tumors: from molecular to clinical studies*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992. **43**(1-3): p. 223-8.
79. Yu, H. and H. Berkel, *Insulin-like growth factors and cancer*. *J La State Med Soc*, 1999. **151**(4): p. 218-23.
80. Brown, N.S. and R. Bicknell, *Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2001. **3**(5): p. 323-7.
81. Fleshner, N.E. and L.H. Klotz, *Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility*. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. **17**(4): p. 325-30.
82. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. *Biotechnol J*, 2006. **1**(4): p. 420-39.
83. Bougnoux, P., et al., *Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth*. *Prog Lipid Res*, 2010. **49**(1): p. 76-86.
84. Simopoulos, A.P., *Essential fatty acids in health and chronic disease*. *Am J Clin Nutr*, 1999. **70**(3 Suppl): p. 560S-569S.
85. Byon, C.H., et al., *Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4*. *Lab Invest*, 2009. **89**(11): p. 1221-8.
86. Yonezawa, T., et al., *Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **367**(4): p. 729-35.
87. Reyes, N., et al., *Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D*. *Cancer Lett*, 2004. **209**(1): p. 25-35.
88. Rozario, T. and D.W. DeSimone, *The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view*. *Dev Biol*, 2010

341(1): p. 126-40.

89. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3(6)**: p. 422-33.
90. Yurchenco, P.D., *Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3(2)**.
91. Page-McCaw, A., A.J. Ewald, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8(3)**: p. 221-33.
92. Ghajar, C.M., S.C. George, and A.J. Putnam, *Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2008. **18(3)**: p. 251-78.
93. Gharagozlian, S., et al., *Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes*. BMC Clin Pathol, 2009. **9**: p. 7.
94. Polette, M., et al., *Tumour invasion and matrix metalloproteinases*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **49(3)**: p. 179-86.
95. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. Int J Dev Biol, 2004. **48(5-6)**: p. 411-24.
96. Lafleur, M.A., M.M. Handsley, and D.R. Edwards, *Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis*. Expert Rev Mol Med, 2003. **5(23)**: p. 1-39.
97. Mook, O.R., W.M. Frederiks, and C.J. Van Noorden, *The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1705(2)**: p. 69-89.
98. Lochter, A., et al., *The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **857**: p. 180-93.
99. Kerkela, E. and U. Saarialho-Kere, *Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer*. Exp Dermatol, 2003. **12(2)**: p. 109-25.
100. Wagenaar-Miller, R.A., L. Gorden, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about?* Cancer Metastasis Rev, 2004. **23(1-2)**: p. 119-35.
101. Ala-aho, R. and V.M. Kahari, *Collagenases in cancer*. Biochimie, 2005. **87(3-4)**: p. 273-86.
102. Jacob, A. and R. Prekeris, *The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis*. Front Cell Dev Biol, 2015. **3**: p. 4.
103. Owman, C., et al., *Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **228(2)**: p. 285-92.
104. Carmeci, C., et al., *Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer*. Genomics, 1997. **45(3)**: p. 607-17.
105. O'Dowd, B.F., et al., *Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes*. Genomics, 1998. **47(2)**: p. 310-3.
106. Takada, Y., et al., *Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240(3)**: p. 737-41.
107. Filardo, E.J., et al., *Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the*

- epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF.* Mol Endocrinol, 2000. **14**(10): p. 1649-60.
108. Prossnitz, E.R., et al., *Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30.* Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 165-90.
 109. Filardo, E.J., et al., *Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis.* Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 70-84.
 110. Prossnitz, E.R. and M. Barton, *Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009. **89**(3-4): p. 89-97.
 111. Kanda, N. and S. Watanabe, *17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression.* J Invest Dermatol, 2003. **121**(6): p. 1500-9.
 112. Kanda, N. and S. Watanabe, *17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression.* J Invest Dermatol, 2004. **123**(2): p. 319-28.
 113. Bashyam, M.D., *Understanding cancer metastasis: an urgent need for using differential gene expression analysis.* Cancer, 2002. **94**(6): p. 1821-9.
 114. Nicolson, G.L., *Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites.* Cancer Metastasis Rev, 1988. **7**(2): p. 143-88.
 115. Mignatti, P. and D.B. Rifkin, *Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion.* Physiol Rev, 1993. **73**(1): p. 161-95.
 116. Arias-Pulido, H., et al., *GPR30 and estrogen receptor expression: new insights into hormone dependence of inflammatory breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(1): p. 51-8.
 117. Pandey, D.P., et al., *Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF.* EMBO J, 2009. **28**(5): p. 523-32.
 118. Filardo, E.J., et al., *Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6359-66.
 119. Anderson, S.G., T.A. Sanders, and J.K. Cruickshank, *Plasma fatty acid composition as a predictor of arterial stiffness and mortality.* Hypertension, 2009. **53**(5): p. 839-45.
 120. Schulz, M., et al., *Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study.* Br J Nutr, 2008. **100**(5): p. 942-6.
 121. Lee, M.M. and S.S. Lin, *Dietary fat and breast cancer.* Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 221-48.
 122. Kris-Etherton, P.M., et al., *Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States.* Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 179S-88S.

123. Serna-Marquez, N., et al., *Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells*. *Med Oncol*, 2017. **34**(6): p. 111.
124. Serna-Marquez, N., et al., *Role of LOXs and COX-2 on FAK activation and cell migration induced by linoleic acid in MDA-MB-231 breast cancer cells*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2013. **36**(1): p. 65-77.
125. Hashimoto, Y., D.J. Kim, and J.C. Adams, *The roles of fascin in health and disease*. *J Pathol*, 2011. **224**(3): p. 289-300.
126. Yoder, B.J., et al., *The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(1): p. 186-92.
127. Snyder, M., et al., *A signal transducer and activator of transcription 3.Nuclear Factor kappaB (Stat3.NFkappaB) complex is necessary for the expression of fascin in metastatic breast cancer cells in response to interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)-alpha*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(43): p. 30082-9.
128. Shibue, T., et al., *The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(8): p. 706-21.
129. Wang, W., et al., *Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling*. *Cancer Res*, 2002. **62**(21): p. 6278-88.
130. Grothey, A., et al., *C-erbB-2/ HER-2 upregulates fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, in human breast cancer cell lines*. *Oncogene*, 2000. **19**(42): p. 4864-75.
131. Al-Alwan, M., et al., *Fascin is a key regulator of breast cancer invasion that acts via the modification of metastasis-associated molecules*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27339.
132. Curran, S. and G.I. Murray, *Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis*. *J Pathol*, 1999. **189**(3): p. 300-8.
133. Duffy, M.J., et al., *Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis*. *Breast Cancer Res*, 2000. **2**(4): p. 252-7.
134. Pellikainen, J.M., et al., *Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(22): p. 7621-8.
135. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(3): p. 161-74.
136. Segarra, M., et al., *Dual function of focal adhesion kinase in regulating integrin-induced MMP-2 and MMP-9 release by human T lymphoid cells*. *FASEB J*, 2005. **19**(13): p. 1875-7.
137. Cortes-Reynosa, P., et al., *Src kinase regulates metalloproteinase-9 secretion induced by type IV collagen in MCF-7 human breast cancer cells*. *Matrix Biol*, 2008. **27**(3): p. 220-31.
138. Kuo, J.C., et al., *Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation*. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(4): p. 383-93.

139. Schiller, H.B., et al., *Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins*. EMBO Rep, 2011. **12**(3): p. 259-66.
140. Elkhatib, N., et al., *Fascin plays a role in stress fiber organization and focal adhesion disassembly*. Curr Biol, 2014. **24**(13): p. 1492-9.
141. Omran, O.M. and M. Al Sheeha, *Cytoskeletal Focal Adhesion Proteins Fascin-1 and Paxillin Are Predictors of Malignant Progression and Poor Prognosis in Human Breast Cancer*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2015. **34**(3): p. 201-12.
142. Grothey, A., et al., *Fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, is upregulated in hormone receptor negative breast cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(7): p. 870-3.
143. Min, K.W., et al., *Fascin expression predicts an aggressive clinical course in patients with advanced breast cancer*. Oncol Lett, 2015. **10**(1): p. 121-130.
144. Aiad, H.A., et al., *Immunohistochemical expression of GPR30 in breast carcinoma of Egyptian patients: an association with immunohistochemical subtypes*. APMIS, 2014. **122**(10): p. 976-84.