



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**Estudio del papel del ácido linoleico sobre las
respuestas biológicas mediadas por IGF1 en células
cancerosas mamarias**

Tesis que presenta

Q.B.P. Ana Karem Rodríguez Rojas

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Biología Celular

Director de tesis: Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Este trabajo fue financiado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgado para el proyecto: Estudio del papel de las oxigenasas Cox y Lox en los procesos de migración e invasión inducidas por el ácido graso linoleico en células cancerosas mamarias, del subprograma de ciencia básica (No. 255429) y también apoyado por el proyecto CB-0182450.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres. Mi mayor fuente de motivación, nunca tendré las suficientes palabras para terminar de agradecerles su apoyo y amor incondicional. Gracias mamá, gracias papá.

A mis hermanos y cuñadas. Gracias por todo su apoyo: Luis Pablo, Joel, Diana Laura, Maria Elena y Armiceli.

Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar. Por su paciencia y apoyo en mi formación académica.

A mi comité tutorial. Gracias Dr. Antony Boucard Jr. y Dr. Guillermo Elizondo Azuela, por su paciencia y aportaciones a mi proyecto de tesis.

Al Dr. Pedro Cortez Reynosa. Por su asistencia técnica y académica.

A mis amigos. Por mostrarse siempre incondicionales. Gracias Q.B.P. Albertana Jiménez, MC. Ciresthel Bello y Dr. Valfredo Villanueva. Los quiero mucho.

A mis amigos de la universidad. A pesar de la distancia, seguimos compartiendo nuestras vivencias, alegrías y total apoyo, gracias Q.B.P. Cristian Hernández, MC. Isimar Serafin, Q.B.P. Carlos Ávila y MC. Yovany Vargas.

A mis compañeros y amigos de generación de maestría. Por hacer amena la estancia de maestría. Especialmente, gracias MC. Kerlys Correoso, mi cubana favorita.

A mis compañeros del laboratorio 42 de biología celular. Por todos los momentos académicos, de ocio y recreación social. Especialmente, gracias Dr. Ricardo Díaz, Dr. Javier Ramírez y Dra. Elia Martínez.

CONTENIDO TEMÁTICO

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
I. INTRODUCCIÓN	8
I.1. Fisiología de la glándula mamaria	8
I.2. Cáncer de mama	8
I.3. Epidemiología.....	9
I.4. Factores de riesgo.....	10
I.4.1. Factores intrínsecos o no modificables.....	10
I.4.2. Factores extrínsecos o modificables.....	11
I.5. Ácidos grasos y cáncer de mama.....	12
I.5.1 Ácido linoleico y cáncer de mama	14
I.6. Obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y cáncer de mama.....	15
I.6.1. Regulación del sistema IGF1/IGF1R	16
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVO GENERAL.....	19
IV.1. Objetivos específicos	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
V.1. Reactivos.	20
V.2. Cultivos celulares	20
V.3. Ensayos de curso temporal.....	20
V.4. Ensayos de Western blot	21
V.5. Ensayos de migración celular por cierre de herida.....	21

V.6. Ensayos de proliferación por incorporación de timidina-(³ H).....	22
V.7. Ensayos de formación de colonias en agar suave	22
V.8. Análisis estadístico.....	23
VI. RESULTADOS	24
VI.1. Expresión de IGF1R en células de cáncer de mama estimuladas con AL.....	24
VI.2. IGF1 induce migración celular en células de cáncer de mama de manera dependiente de la dosis.....	25
VI.3. IGF1 incrementa la tasa de proliferación de células tumorales de mama.	27
VI.4. EL pre-tratamiento con AL disminuye la proliferación celular a través del sistema IGF1/IGF1R en células MDA-MB-231	30
VI.5. El pre-tratamiento con AL favorece la formación de colonias inducida IGF1/IGF1R en células MDA-MB-231.	32
V.6. El pre-tratamiento con AL incrementa el potencial migratorio en células de cáncer de mama, mediado por el sistema IGF1/IGF1R.....	35
VII. DISCUSIÓN	38
VIII.CONCLUSIÓN	43
IX. PERSPECTIVAS.....	43
X. REFERENCIAS.....	44

RESUMEN

El consumo elevado de ácidos grasos poliinsaturados durante periodos largos de tiempo, se ha relacionado fuertemente con el desarrollo de obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y cáncer. La regulación metabólica de los ácidos grasos durante la obesidad y DM2, conlleva a la activación del sistema IGF1/IGF1R. Numerosos estudios han demostrado la participación de este sistema en el desarrollo y progresión de cáncer de mama, mediante la activación de vías de señalización relacionadas con proliferación y supervivencia celular. Sin embargo, no existen datos acerca de la relación entre el ácido linoleico (AL) y el sistema IGF1/IGF1R en cáncer de mama. En este estudio, se evaluó el papel del AL sobre la formación de colonias, proliferación y migración celular, a través del sistema IGF1/IGF1R, en líneas celulares de cáncer de mama con diferente grado de transformación. Nuestros resultados indican que, el pre-tratamiento con AL incrementa la expresión del receptor a IGF1, el cual, tras ser estimulado con IGF1, regula la tasa de proliferación y crecimiento celular, favoreciendo mayormente el potencial migratorio de células MDA-MB-231, pero no de las células MCF-7. En resumen, nuestros resultados indican que el AL, a través del sistema IGF1/IGF1R, modula los procesos biológicos implicados en la progresión tumoral hacia un fenotipo agresivo de células cancerosas mamarias.

ABSTRACT

The high intake of polyunsaturated fatty acids for long periods is widely associated with obesity, diabetes mellitus type 2 (DM2) and cancer risk. Regulation of fatty acids metabolism during obesity and DM2 leads to IGF1/IGF1R system activation. A large number of studies has been related with IGF1/IGF1R system and breast cancer development and progression, because of activation of signaling pathways associated with cell proliferation and cell survival. However, data about the link between linoleic acid (LA) and the IGF1/IGF1R system in breast cancer are still scarce. In this study we evaluated the role of LA on cell colony formation, proliferation and migration, by IGF1/IGF1R system activation in different breast cancer cells lines. Our results demonstrate that AL pre-treatment increases IGF1 receptor levels, which, when stimulated with IGF1, regulates cell proliferation and growth rates, while favoring the migratory potential of MDA-MB-231 cell line, without affecting MCF-7 cell line. In summary, our results indicate that LA, via IGF1/IGF1R system, modulates the biological processes involved in tumor progression to an aggressive breast cancer cell phenotype.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Fisiología de la glándula mamaria

La glándula mamaria se conforma por tejido epitelial rodeado de tejido adiposo, tejido conectivo e irrigados por vasos linfáticos y sanguíneos. El tejido epitelial se divide en dos grandes sistemas: el sistema glandular y el sistema ductal; el primero a su vez constituido por 20-40 glándulas productoras de leche conocidas como lóbulos, conectadas al sistema ductal por largas estructuras tubulares por donde fluye la leche, desembocando inmediatamente debajo del complejo pezón-areola. El tejido conectivo y adiposo además de brindar soporte y estructura, proporcionan un ambiente endócrino favorable, que en conjunto con el entorno mamario se encargan de la homeostasis en el crecimiento, diferenciación, así como también en el desarrollo tumoral [1].

La glándula mamaria es el único órgano que se somete a constantes cambios en composición, arquitectura y funcionalidad. Estos cambios están regidos principalmente por los ovarios, hasta llegar a la maduración funcional en la adultez e involucionar paralelamente a la pérdida de función ovárica, razón por la que es susceptible a la acumulación de cambios en el programa genético y epigenético [2-3].

I.2. Cáncer de mama

De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer (ACS por sus siglas en inglés) el cáncer de mama “*comienza cuando las células en la mama comienzan a crecer fuera de control*”. Esta neoplasia puede originarse a partir de cualquier tipo celular que conforma el epitelio mamario; por lo tanto se denomina “carcinoma ductal” si se desarrolla en el sistema ductal o “carcinoma lobular/lobulillar” en caso de iniciar en el sistema glandular, siendo más frecuente e incidente el carcinoma de células ductales. Por lo que, más del 80% de los casos de cáncer invasivos se desarrollan en los ductos. Debido a

sus características heterogéneas, existen hasta 21 tipos histológicos y por lo menos 4 principales subtipos moleculares, dentro de los cuales encontramos los “carcinomas de mama triple negativo o tipo basal” (negativo a receptores de progesterona, estrógenos y HER2), “luminal A” (positivo a receptores de estrógenos, progesterona y negativo a HER2), “luminal B” (positivo a receptores de estrógenos, progesterona y HER2) y positivo a HER2 (sobreexpresa HER2) [1,4].

Diferentes etapas fisiopatológicas caracterizan la evolución del cáncer de mama desde un tipo “*in situ*” hasta un fenotipo “invasivo o infiltrante”. Una característica inicial es la hiperproliferación indefinida de células epiteliales ductales. Los ductos están rodeados por la membrana basal que separa las células epiteliales y mioepiteliales ductales del entorno mamario, en donde se encuentran fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales y células inmunes circundantes. El cúmulo creciente de células tumorales mantiene constante comunicación con el entorno mamario, proceso que puede durar varios años hasta que las células logran romper la membrana basal, adquirir características invasivas, entrar a circulación y llegar a órganos distantes formando tumores secundarios (metástasis) [3].

I.3. Epidemiología

A nivel mundial, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se detectan 1.7 millones de nuevos casos, que representan el 25% del total de casos de cáncer. En 2012, la tasa de incidencia global fue de 43.1% por cada 100,000 habitantes de la población adulta, mientras que la tasa de mortalidad fue de 12.9%, distribuidos mayoritariamente en países desarrollados de América y Europa [5].

En México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en conjunto con el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAVECE) y el Consejo Nacional de Población (CONAPO), registraron la

incidencia de cáncer de mama durante el periodo 2007-2015, encontrando 27.9 casos por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años distribuidos a lo largo del país. De igual manera, el estudio arrojó que el mayor número de registros se concentró en el grupo de mujeres posmenopáusicas en el rango de edad de 60-64 años, mientras que la tasa de mortalidad se mantuvo en aproximadamente 15 defunciones por cada 100,000 habitantes en comparación con años previos en el que se registró 14 defunciones [6].

I.4. Factores de riesgo

Las tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de mama entre países desarrollados y en vías de desarrollo están influenciadas por diferentes factores de riesgos, incluyendo factores intrínsecos o no modificables, propios de la población y extrínsecos o modificables, atribuidos al estilo de vida [6].

I.4.1. Factores intrínsecos o no modificables

Aproximadamente el 5-10% de los casos de cáncer de mama tienen origen hereditario. Se han descrito mutaciones germinales en los genes supresores de tumores BRCA1, BRCA2 y TP53, que incrementan el riesgo de cáncer de mama y ovario hasta un 70%, en comparación con quienes no la presentan. Las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 están asociadas a tumores de mama altamente proliferativos en mujeres jóvenes [7].

Por otra parte, mutaciones en miembros de la familia del receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR), especialmente en HER2, están asociadas con fenotipos proliferativos con bajo pronóstico de vida, debido en parte al eje regulador que HER2 mantiene con los receptores a progesterona (PR) y estrógenos (ER). Por otro lado, mutaciones en los genes PTEN, CDH1, STK11, BARD1 y/o PALB2 también han sido relacionadas con el riesgo potencial de padecer cáncer de mama aunque con menor penetrancia [4, 7, 8].

Los factores reproductivos y endócrinos propios de la mujer también han sido relacionados con el riesgo de padecer cáncer de mama. Entre estos factores encontramos la densidad mamaria, la edad de inicio de la menarca, la edad del primer embarazo, la nuliparidad, así como el inicio tardío de la menopausia. La razón por la que se convierten en factores de riesgo, se debe a que exponen al tejido mamario al efecto mitogénico de estrógenos durante periodos largos de tiempo [4].

Dado que el mayor número de casos de cáncer de mama se concentran en grupos de mujeres posmenopáusicas, la edad y la menopausia tardía (después de los 55 años) representan mayor riesgo relativo comparado con otros factores reproductivos. En mujeres con menopausia tardía el riesgo de padecer cáncer de mama incrementa 12 veces, sumado al riesgo que representan la presencia de otros factores [4].

I.4.2. Factores extrínsecos o modificables

Una tercera parte de los registros de cáncer de mama están epidemiológicamente asociados con el estilo de vida, ejemplo de ello es el sedentarismo. De acuerdo con datos recopilados por Thune y colaboradores en el año 2001, la actividad física moderada disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de mama, ovario y endometrio hasta un 30% en mujeres pre, peri y posmenopáusicas. Otros hábitos como el consumo de bebidas alcohólicas de manera frecuente o moderada, originan metabolitos secundarios que intervienen en la síntesis del receptor de estrógenos; mujeres pre o posmenopáusicas cuyo consumo de alcohol es de 10 gramos (una bebida) por día tienen de 7-10 veces más riesgo de presentar cáncer de mama que las mujeres no consumidoras, riesgo que incrementa con la cantidad, tipo de alcohol y consumo de tabaco [9, 10]

Diversos estudios han examinado la relación entre los hábitos alimenticios y el inicio o progresión de cáncer de mama. Enfocándose principalmente en el estudio de ácidos grasos (AGs), basados en modelos celulares de cáncer de

mama, se ha demostrado que los AGs que forman parte de las dietas occidentales, activan múltiples cascadas de señalización que regulan proliferación, migración e invasión celular [11–15]. No obstante, el consumo de dietas ricas en AGs también se asocia con el riesgo de padecer patologías cardiovasculares como obesidad o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que de hecho, están relacionadas como factores de riesgo independientes en la evolución de cáncer de mama [16].

Diversos estudios han establecido una relación entre el peso corporal y cáncer de mama, concluyendo que el riesgo es 30-50% mayor en mujeres obesas posmenopáusicas (con un índice de masa corporal >28), comparado con mujeres obesas premenopáusicas. Este porcentaje de riesgo es atribuido a los bajos niveles de estradiol registrados en mujeres premenopáusicas obesas, como consecuencia de los ciclos anovulatorios [16, 17].

Las tasas de prevalencia de obesidad incrementan paralelamente a los registros nuevos de DM2 a edades cada vez más cortas. En la población adulta mexicana, 9.17% padecen DM2 y es la segunda causa de muerte en el país, teniendo como principal factor de riesgo modificable la obesidad. Datos epidemiológicos recientes demuestran que existe un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, próstata, hígado, páncreas, colorectal, vejiga y endometrio en pacientes con obesidad y DM2; comparados con pacientes que solo presentan obesidad o DM2. Esta tendencia es atribuida a las concentraciones elevadas de insulina y del factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF1), los cuales se elevan durante el estado de obesidad y DM2, funcionando como inductores de crecimiento tumoral. Sin embargo, son pocas las investigaciones enfocadas en conocer los mecanismos de regulación que conllevan al desarrollo secuencial de cada una de estas patologías [18–20].

I.5. Ácidos grasos y cáncer de mama

Los AGs se clasifican en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (SFA, MUFAs y PUFAs, por sus siglas en inglés) basándose en la cantidad de

saturaciones o dobles enlaces presentes en su estructura química. La cadena de carbonos de los AGs tienen un grupo metilo en un extremo (conocido como carbono ω) y un grupo carboxilo en el extremo opuesto. De acuerdo a esto, los PUFAS se subclasifican en ω -3, ω -6 y ω -9, dependiendo de la ubicación de la primera saturación en la cadena carbonada, partiendo del carbono ω . Los SFAs generalmente son de cadena corta (1-6 carbonos) mientras que los MUFAs y PUFAs suelen tener una estructura química mediana o larga (6-22 carbonos) [21].

Los AGs son la principal fuente de almacenamiento y transporte de energía, forman parte de las membranas celulares, participan en el aislamiento térmico-mecánico y regulan diferentes señales a través de sus receptores FFARs (free fatty acid receptors, por sus siglas en inglés) distribuidos en tejido adiposo, hígado, páncreas y células del sistema inmunológico [21, 22].

Los FFARs son una familia de receptores acoplados a proteínas G. Esta familia comprende principalmente 4 miembros formalmente conocidos como FFAR1 (GPR40), FFAR2 (GPR43), FFAR3 (GPR41) y FFAR4 (GPR120). La activación de los FFARs fisiológicamente está relacionada con la secreción de insulina, modulación de respuestas inflamatorias, diferenciación de preadipocitos y viabilidad de células pancreáticas. Dado que sus funciones están relacionadas principalmente con metabolismo energético, se han vinculado con el riesgo de desarrollar obesidad y DM2, pero también se han asociado con el riesgo de desarrollar cáncer [22].

Específicamente en cáncer, las señales reguladas por AGs difieren dependiendo del tipo de AG y del tipo de neoplasia. Los agonistas de FFAR2 y FFAR3 son SFAs de cadena corta que generalmente son metabolitos secundarios de bacterias, por lo que estos receptores se encuentran sobreexpresados en epitelio intestinal y adiposo. La expresión de FFAR2 y FFAR3 en tumores es baja y suele estar asociada como factor protector, especialmente de células intestinales [22].

Por otra parte, los AGs de cadena mediana o larga (MUFAs o PUFAs de 6-22 carbonos) son agonistas de FFAR1 y FFAR4. Estos receptores están acoplados a proteínas $G_{q/11}$ y $G_{i/o}$ encontrándose expresados en órganos encargados del metabolismo energético, así como también en fibrosarcomas, melanomas, tumores de páncreas, próstata, ovario y mama [22, 23].

Estudios en modelos murinos y modelos celulares, han demostrado la importancia de las dietas basadas en MUFAs y PUFAs en la carcinogénesis mamaria, en donde se concluyó que la restricción de MUFAs y PUFAs de la dieta disminuye hasta un 30% la progresión del cáncer de mama. El metabolismo de MUFAs y PUFAs genera moléculas bioactivas responsables de modular los diferentes eventos que conllevan a la progresión del cáncer. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos celulares implicados [11].

Las fuentes de MUFAs y PUFAs son principalmente semillas y aceites de semillas de alto consumo en las dietas occidentales. En México, la dieta típica está basada en un alto contenido de PUFAs ω -6 y bajo de vegetales y fibra, lo que representa un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, especialmente en mujeres obesas posmenopáusicas. Chàjés y colaboradores en 2011, demostraron que el cambio de los hábitos alimenticios, epidemiológicamente, es un factor protector para mujeres mexicanas que presentan obesidad después de la menopausia [24].

I.5.1 Ácido linoleico y cáncer de mama

El AG de mayor consumo en las dietas occidentales es el ácido linoleico (AL), cuya estructura se conforma de 18 átomos de carbono con 2 insaturaciones, por lo que sistemáticamente se considera PUFA ω -6 (18:2: ω -6). El AL es un AG esencial, es decir, no puede ser sintetizado *de novo* por el organismo, por lo que la fuente de suministro proviene principalmente de la dieta diaria. Este PUFA se encuentra presente en semillas de girasol, canola, maíz, algodón, uvas, algunos cortes de carne, margarinas y mantequillas [21].

El metabolismo del AL involucra pasos secuenciales de desaturación y elongación de la cadena carbonada que conforma este AG, dando lugar a importantes metabolitos secundarios como el ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA) y ácido araquidónico (AA), los cuales son utilizados como precursores de otras rutas bioquímicas [25].

El AL es fuente importante de energía, sin embargo, también está implicado en los procesos de diferenciación durante la etapa de pubertad y lactancia. Así mismo, debido a su naturaleza energética se ha relacionado fuertemente con el desarrollo de patologías cardiovasculares como obesidad, hipertensión, DM2 y cáncer [26]. La relación entre el AL y el riesgo de cáncer de mama fue demostrado por Zhou y colaboradores en el año 2015 [27]. Por otro lado, numerosos estudios en modelos celulares y animales han demostrado los efectos del AL y sus metabolitos sobre procesos proliferativos, migratorios, invasivos y metastásicos en cáncer de mama [13], [27–30]. Los mecanismos implicados son múltiples y se encuentran relacionados con la generación de metabolitos pro-inflamatorios, la activación de vías de señalización mediante los receptores FFAR1 y/o FFAR4 y modulación genética diferencial [23].

En nuestro equipo de trabajo, recientemente se demostró que la activación de FFAR1 y/o FFAR4 tras el estímulo con AL, inducen procesos de migración e invasión en modelos celulares de cáncer de mama [22, 25].

I.6. Obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y cáncer de mama

Múltiples estudios epidemiológicos asocian la obesidad como factor de riesgo para el desarrollo de DM2. De hecho, gran parte de la población que padece obesidad, desarrolla DM2. Esta relación se debe a las funciones endócrinas y metabólicas que el tejido adiposo efectúa sobre los órganos encargados del metabolismo energético [18–20].

Durante la obesidad frecuentemente se presentan estados crónicos de hiperlipidemia, hiperglicemia y resistencia a insulina que progresa a hiperinsulinemia (característica principal de DM2) [14, 16, 19, 26–29]. En este

punto, las funciones metabólicas se centran en internalizar el exceso de glucosa plasmática, a través de la sensibilización de los receptores de insulina. Para ello, se activan diferentes mecanismos que incluyen la liberación o disminución de adipocitocinas por parte de los adipocitos, la síntesis de IGF1 en tejido hepático y la expresión del receptor a IGF1 (IGF1R) en tejidos encargados del metabolismo energético [32]. Pese a estos cambios metabólicos, las funciones del tejido hepático, muscular y adiposo no logran reducir los niveles elevados de lípidos, glucosa e insulina, creando un ambiente endócrino agresivo para los epitelios que expresen receptores a insulina, IGF1 y las diferentes adipocitocinas circundantes [16, 26].

Estudios epidemiológicos y en modelos celulares han comprobado que la hiperlipidemia, hiperglicemia, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia conducen a proliferación celular y crecimiento tumoral, mediante la activación de sus receptores [16]. En este contexto, estudios recientes confirman que la hiperinsulinemia se asocia con el riesgo de desarrollar cáncer de mama no solo a través de los efectos mitogénicos propios de la insulina, sino también de manera indirecta a través de la activación del sistema IGF1/IGF1R [19, 30, 31].

I.6.1. Regulación del sistema IGF1/IGF1R

En estado fisiológico, el sistema IGF1/IGF1R controla las tasas de proliferación y supervivencia en respuesta a la dieta, así como también está relacionado en metabolismo energético, diferenciación celular órgano-específica durante la embriogénesis y envejecimiento. Estudios experimentales, indican que también participa en la proliferación y metástasis de células cancerosas [36].

El sistema IGF1/IGF1R, está conformado por el IGF1, IGF2, sus receptores (IGF1R e IGF2R, respectivamente) y la familia de proteínas de unión a IGF (IGFBPs). Estos factores de crecimiento reciben su nombre por la analogía estructural y funcional que mantienen con la insulina y sus receptores. Biológicamente, los receptores de IGFs están formados por dos cadenas α y

dos cadenas β , que son homólogas con las cadenas α y β de los receptores de insulina tipo A (IRA) y tipo B (IRB), por lo que tienden a formar heterotetrámeros híbridos. Aunque existen pocos datos acerca de la función de estos receptores híbridos, estudios *in situ* e *in vitro* han demostrado su expresión en diferentes tejidos, incluyendo el tejido de mama [32–34].

Los receptores IGF1R e IGF2R activan señales diferentes, a pesar de estar categorizados como receptores con actividad tirosina cinasa (RTKs). El IGF1R únicamente tiene actividad cinasa, mientras que IGF2R regula el tráfico vía lisosomal. La unión de IGF1, IGF2 o insulina a IGF1R desencadena dos principales vías de señalización a través de IRS (sustrato del receptor a insulina): la vía PI3K/AKT/mTORC y la vía RAF/MAPK que estimulan crecimiento, proliferación, supervivencia, síntesis de proteínas y diferenciación celular. Por el contrario, si alguno de los ligandos se unen a IGF2R, se internalizará y degradará vía lisosomal, regulando negativamente el sistema [37].

El sistema IGF1/IGF1R está altamente regulado, en primera instancia por la familia de IGFBPs, que funcionan como inhibidores biológicos, se unen a IGF1 e IGF2 con mayor afinidad incluso que sus propios receptores. Después de ser sintetizados en hígado, los ligandos se liberan a circulación en forma de complejos IGFBP-IGF, los cuales al llegar a sus tejidos blanco son separados por degradación de IGFBP mediante proteasas tejido-específicas, permitiendo la liberación del ligando [40]. Otros reguladores importantes en el sistema IGF1/IGF1R están relacionados con la síntesis y expresión de la hormona de crecimiento y los receptores de estrógenos en hígado y epitelio de mama [16].

Fisiológicamente, las células de epitelio mamario expresan los receptores a insulina e IGF1, que desempeñan funciones vitales durante la pubertad, embriogénesis y lactancia. Diversas investigaciones sugieren que IGF1R e IR se sobreexpresan durante el estado de obesidad y DM2, por ello, se ha relacionado fuertemente con el riesgo de desarrollar cáncer de mama [31, 36].

En nuestro equipo de trabajo, recientemente se demostró un nuevo eje de regulación dado entre el AL e IR en células tumorales de mama. En este estudio se observó sobreexpresión del receptor de insulina en respuesta al estímulo con AL. Por otro lado, el pre-tratamiento de las células con AL y posteriormente la estimulación con insulina, tanto la proliferación, migración e invasión celular modulados por IR se incrementaron, concluyendo que el AL, a través de IR, media la transición hacia fenotipos mayormente agresivos de cáncer de mama [42]. Los resultados encontrados sugieren que también puede existir un eje de regulación entre los efectos del AL y el sistema IGF1/IGF1R. Sin embargo, esta hipótesis hasta ahora no ha sido demostrada.

II. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la segunda neoplasia con mayor incidencia y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo. Entre los factores de riesgo asociados con esta neoplasia, se encuentran el consumo de dietas ricas en AGs durante periodos largos de tiempo, situación que predispone a padecer desórdenes metabólicos como obesidad, DM2 y cáncer. El desarrollo de obesidad es un factor de riesgo para DM2 y ambas incrementan la probabilidad de padecer cáncer de mama. La regulación metabólica de los AGs durante la obesidad y DM2 conlleva a la activación del sistema IGF1/IGF1R como mecanismo compensatorio al estado de hiperinsulinemia. Tanto la insulina como IGF1 regulan múltiples funciones en los diferentes tipos celulares que expresen sus receptores. Diversos estudios han demostrado la participación del sistema IGF1/IGF1R en el desarrollo y progresión de cáncer de mama, mediante la activación de vías de señalización relacionadas con proliferación y supervivencia celular. Utilizando modelos celulares de cáncer de mama se demostró un eje de regulación entre el AL e insulina/IR que favorecen el inicio y progresión del cáncer de mama. Sin embargo, por la homología estructural existente entre la insulina e IGF1, se ha propuesto que el AL, a través del sistema IGF1/IGF1R, puede regular diferentes eventos biológicos en células de cáncer de mama.

III. HIPÓTESIS

El AL induce incremento en la expresión del IGF1R e incrementa las respuestas a IGF1 en células cancerosas mamarias.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el AL induce incremento en la expresión del IGF1R e incrementa la respuesta a IGF1 en células cancerosas mamarias.

IV.1. Objetivos específicos

- Analizar el perfil de expresión del receptor de IGF1 en células de cáncer de mama estimuladas con o sin AL.
- Evaluar el efecto de IGF1 sobre la proliferación celular en células de cáncer de mama pre-estimuladas con o sin AL.
- Estudiar el papel del IGF1 en la migración de células cancerosas mamarias pre-estimuladas con o sin AL.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Reactivos. Anticuerpos primarios: Anticuerpo anti-IGF1R subunidad β (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo anti-actina (donado por el Dr. José Manuel Hernández del departamento de Biología Celular).

Anticuerpos secundarios: Anticuerpo policlonal anti-mouse y anticuerpo anti-rabbit acoplados a peroxidasa de rábano (Zymed Laboratories Inc.).

Estímulos: Ácido linoleico (Santa Cruz Biotechnology. Cat. SC-215247), IGF1 (Sigma-Aldrich. Cat. 13769-50UG), timidina-(^3H) 1 mCi/mL o 37 MBq (PerkinElmer. NET355001MC).

Inhibidores: Picropodofilina (PPP) (ChemCruz. Cat.204008).

V.2. Cultivos celulares. Las líneas celulares de carcinoma mamario MDA-MB-231 y MCF-7 fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% y antibióticos, en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO_2 , a 37 °C.

V.3. Ensayos de curso temporal. Cultivos celulares MDA-MB-231 y MCF-7 fueron crecidos a confluencia en cajas Petri de 60 mm y colocados en supresión con medio sin suero por 24 horas previas a la estimulación. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x estéril (K_2HPO_4 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) y estimulados con 100 ng/mL de IGF1 para MDA-MB-21 y 50 ng/mL para MCF-7, contenidos en medio fresco DMEM

sin SFB por 0, 5, 10, 20 y 30 horas, las concentraciones utilizadas, fueron obtenidas mediante ensayos de dosis-respuesta. Concluidos los tiempos de incubación, el medio fue aspirado y las células fueron recolectadas en amortiguador de lisis RIPA 1x (NaVO₃ 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 1 mM, coctel de inhibidores de proteasas 1x) y concentradas por centrifugación durante 12 minutos a 12,000 rpm a 4°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

V.4. Ensayos de Western blot. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida al 8% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada usando 5% de leche descremada en solución de lavado (PBS 1x/tween-20 al 0.1%), seguido de la incubación de la membrana con el anticuerpo primario anti-IGF1R (1:1000) o anti-actina (1:200) durante toda la noche a 4 °C. La membrana fue lavada tres veces con PBS 1x/tween-20 0.1% durante 10 minutos e incubada con el anticuerpo secundario en solución de lavado conteniendo leche descremada al 5% por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, otros 3 lavados de 10 minutos cada uno, fueron realizados con PBS 1x/tween-20 0.1% durante 10 min. La detección se llevó a cabo utilizando los reactivos de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y placas autoradiográficas (KODAK).

V.5. Ensayos de migración celular por cierre de herida. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron sembrados en cajas Petri de 35 mm hasta alcanzar 90-100% de confluencia, posteriormente fueron sometidos a supresión de suero durante 24 horas. En seguida, las células fueron tratadas con mitomicina C (12 µM) durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se les realizó una rayadura con la punta de una pipeta estéril de 200 µl, se lavaron 2 veces con PBS 1x estéril y se les adicionó medio fresco sin SFB conteniendo los estímulos correspondientes. Los cultivos fueron incubados durante 48 horas en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂, a 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación, el medio de cultivo fue

retirado, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 minutos y teñidas con cristal violeta (metanol 25%, etanol 25%, PBS 1x, paraformaldehído 4%). El análisis se realizó midiendo el porcentaje del área entre los bordes de la rayadura mediante el programa ImageJ 1.48v.

V.6. Ensayos de proliferación por incorporación de timidina-(³H). Cultivos celulares de MDA-MB-231 y MCF-7 fueron crecidos en cajas Petri de 35 mm hasta una confluencia de 60-70%. Los cultivos fueron puestos en medio DMEM sin suero durante 12-16 horas. Pasado el tiempo de ayuno, se les realizó un lavado con PBS 1x a temperatura ambiente y fueron incubados durante 10, 24 y 48 horas a 37°C con 2 mL de medio DMEM conteniendo AL y/o IGF1 a diferentes concentraciones, según el requerimiento. Concluido este tiempo, se les añadió 1 µl/mL de timidina-(³H) (1 µCi/mL) y se incubaron por 4 horas a 37°C. La incorporación de timidina-(³H) fue detenida mediante la aspiración del medio. La radiactividad soluble fue removida al incubar con ácido tricloracético (TCA) al 5% por 20 minutos a 4°C. Las cajas Petri fueron lavadas con etanol absoluto permitiendo su evaporación, en seguida, las células fueron solubilizadas por agitación constante con 1 mL de NaOH (0.1 M) disuelto en Na₂CO₄ (2%) por 30 minutos. Las muestras fueron recuperadas en frascos de lectura. Finalmente, 4 mL de acuasol-2 (1,2,4-trimetilbenceno, xileno y alquifenol etoxilado) fueron añadidos. La radiactividad incorporada fue medida en un contador de centelleo líquido Beckman LSC-6000 y los datos obtenidos fueron graficados mediante el programa GraphPad Prism 5.0.

V.7. Ensayos de formación de colonias en agar suave. Cultivos de células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron sembrados en cajas Petri de 70 mm y crecidos hasta alcanzar 90% de confluencia. Posteriormente, los cultivos fueron sometidos a supresión de SFB durante 12-16 horas. Una caja fue tratada con AL 90 µM/mL durante 10 horas. Antes de iniciar con el plaqueo, las agarosas al 0.5% y 0.7% fueron fundidas y atemperadas a 42°C durante 30 minutos. Una vez atemperadas, se procedió a preparar el agar base homogenizando agarosa al 0.7% a 42 °C + DMEM 2x suplementado con SFB al 5% a 37°C

(volumen 1:1). 500 μ L del homogenado fue plaqueado en cajas de 12 pozos. Durante el tiempo de solidificación del agar base, las células fueron despegadas con tripsina al 0.25% + verseno al 0.02% a 37°C (volumen 1:1), concentradas por centrifugación durante 5 minutos y resuspendidas en \approx 3 mL de medio DMEM 1x a 37 °C. En seguida, las células fueron contabilizadas mediante el uso de hematocitómetro. Sobre el agar base sólido, 1×10^4 células fueron sembradas, embebidas en 500 μ L de agar suave (agarosa al 0.5% a 42°C + medio DMEM 2x suplementado con SFB 5% a 37°C, volumen 1:1). El agar suave se dejó polimerizar por 20-30 minutos a temperatura ambiente y después durante \approx 15 horas en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂, a 37 °C. Posteriormente, se les adicionó el estímulo correspondiente, contenido en 1 mL de medio fresco sin SFB, el cual fue cambiado cada 3 días durante 3 semanas. Concluido el tiempo de incubación, el medio fue removido y las colonias formadas fueron teñidas con 500 μ L de cristal violeta al 0.1% (cristal violeta 0.3%, etanol absoluto 0.5%, agua destilada). Los agares se lavaron 5-7 veces con 1 mL de agua destilada durante 10 minutos. Finalmente, se tomaron fotografías de cada condición experimental. Las imágenes fueron procesadas con el analizador de partículas del programa ImageJ 1.48v.

V.8. Análisis estadístico. Los resultados fueron expresados con una media \pm D.E. Los datos fueron examinados mediante análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los resultados fueron graficados mediante el programa estadístico GraphPad Prism 5.0.

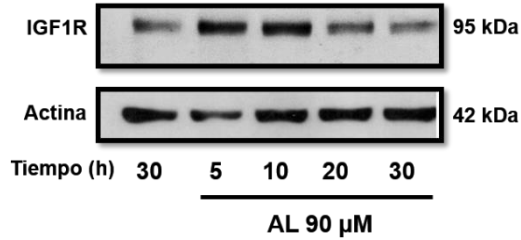
VI. RESULTADOS

VI.1. Expresión de IGF1R en células de cáncer de mama estimuladas con AL.

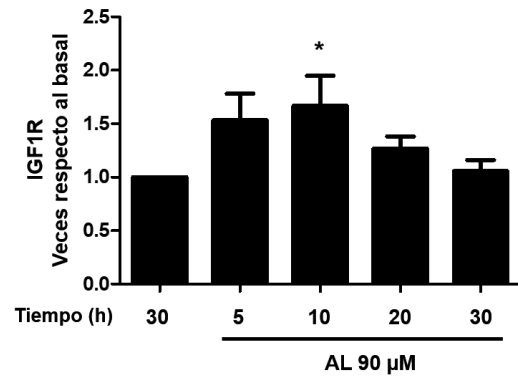
Datos previos de nuestro grupo de trabajo demostraron que estimulaciones con 90 $\mu\text{M/mL}$ de AL en células MDA-MB-231 indujeron la activación de proteínas implicadas en migración e invasión celular [29], por lo cual, se utilizó esta concentración en los siguientes experimentos. Para conocer el efecto del AL sobre la expresión de IGF1R, se utilizaron dos modelos celulares de cáncer de mama, con diferente capacidad invasiva. La línea celular MDA-MB-231 fue elegida por presentar un fenotipo altamente metastásico y la línea celular MCF-7 por presentar alto potencial de proliferación y baja capacidad invasiva. Se realizaron ensayos de curso temporal, para lo cual las células fueron estimuladas durante 0, 5, 10, 20 y 30 horas utilizando 90 $\mu\text{M/mL}$ de AL. Mediante la técnica de “western blot”, se demostró que el AL induce expresión de IGF1R en ambas líneas celulares, como se muestra en la figura 1. En células MDA-MB-231, se observó un incremento a partir de las 5 horas, con un pico máximo de expresión a 10 horas de tratamiento (figura 1A y 1B). Por otro lado, en células MCF-7, resultados preliminares indican que la expresión de IGF1R se incrementa desde las 5 horas, con posterior disminución hasta las 30 horas de tratamiento (figura 1C y 1D). Los datos obtenidos fueron comparados con la condición sin estímulo y normalizados contra el control de carga, para lo cual las membranas fueron re-incubadas con el anticuerpo anti-actina.

MDA-MB-231

A

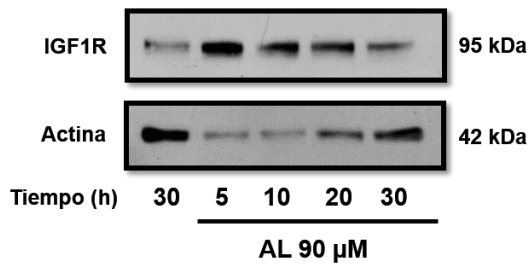


B



MCF-7

C



D

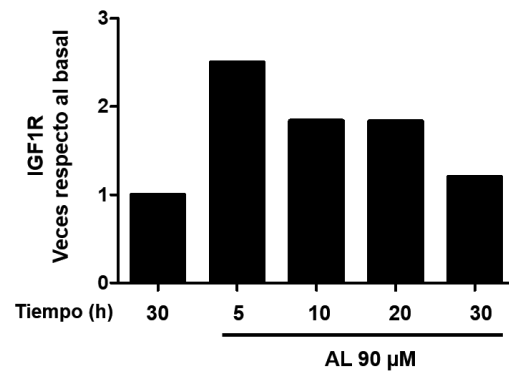


Figura 1. El AL induce incremento en la expresión de IGF1R en células de cáncer de mama. Las células MDA-MB-231 (A y B) y MCF-7 (C y D) fueron sometidas a supresión de SFB durante 24 horas y estimuladas con 90 µM/mL de AL, a diferentes tiempos. **A** y **C**, se muestran imágenes representativas de los blots correspondientes a la inmunodetección de IGF1R y actina. **B** y **D**, se muestran las gráficas correspondientes al análisis densitométrico de un experimento para MCF-7 y cuatro experimentos independientes para MDA-MB-231. * $P < 0.05$.

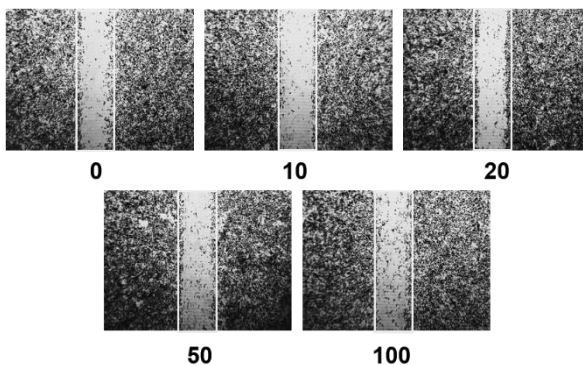
VI.2. IGF1 induce migración celular en células de cáncer de mama de manera dependiente de la dosis.

Con la finalidad de conocer el efecto de IGF1 sobre el potencial migratorio de las células MDA-MB-231 y MCF-7, se realizaron ensayos dosis-respuesta

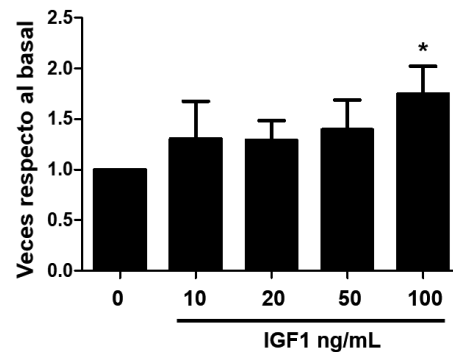
empleando la técnica de migración por cierre de herida. Para lo cual, cultivos confluentes de células de cáncer de mama, fueron sometidos a supresión de SFB. Posteriormente, se les realizó una rayadura en el centro de la caja y se estimularon con concentraciones crecientes de IGF1 por 48 horas. El potencial de migración se evaluó en respuesta a dosis de 0, 10, 20, 50 y 100 ng/mL de IGF1 [43][43][41][40][39][38]. El porcentaje de migración se obtuvo midiendo la distancia entre los bordes de la rayadura en cada condición, los datos obtenidos fueron normalizados contra la condición sin estímulo. Los resultados ilustrados en la figura 2, indican que en la línea celular MDA-MB-231, IGF1 indujo migración a una dosis de 100 ng/mL (figura 2A y B). Sin embargo, en células MCF-7 el efecto de IGF1 sobre la migración celular, es observable a dosis mayores a 20 ng/mL, alcanzando el pico máximo a una concentración de 50 ng/mL (figura 2C y D).

MDA-MB-231

A

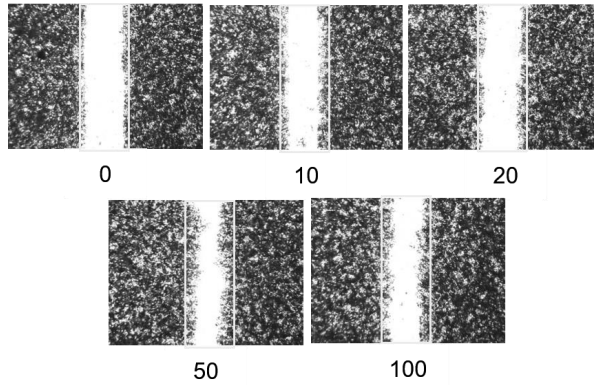


B



MCF-7

C



D

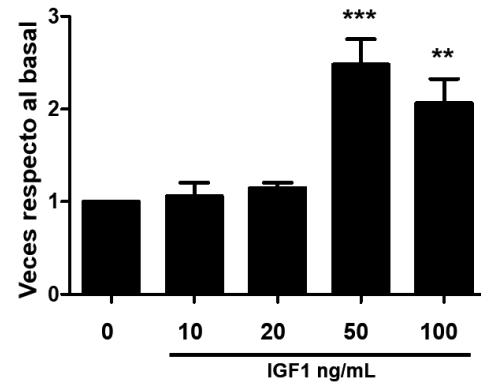


Figura 2. IGF1 induce migración en células de cáncer mamario de manera dependiente de la concentración. Células MDA-MB-231 (A y B) y MCF-7 (C y D) fueron ayunadas y estimuladas con concentraciones crecientes de IGF1 durante 48 horas. **A y C.** Imágenes representativas del cierre de herida en respuesta a 0, 10, 20, 50 y 100 ng/mL de tratamiento con IGF1. **B y D.** Análisis densitométrico y estadístico de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

VI.3. IGF1 incrementa la tasa de proliferación de células tumorales de mama.

El papel de IGF1 sobre procesos proliferativos en células de tumores mamarios ya ha sido analizado mediante diferentes estrategias experimentales. Las metodologías más utilizadas en modelos *in vitro*, se basan en la lectura por colorimetría, de metabolitos generados por las células viables o por células que entran en apoptosis. Estas metodologías tienen mayor probabilidad de arrojar datos falsos positivos o falsos negativos con mayor facilidad, debido a su baja sensibilidad, en comparación con otras técnicas de proliferación y viabilidad celular. Por tal motivo, en este estudio se empleó una técnica con mayor sensibilidad, que mide proliferación celular directamente durante la fase de síntesis de DNA. Los ensayos de proliferación por incorporación de timidina-(^3H), están basados en la incorporación de un

nucleósido radiactivo (timidina acoplada a ^3H) en las cadenas de DNA cromosómico sintetizadas *de novo* durante el proceso de mitosis [39, 40].

No obstante, el tiempo de duplicación celular en todos los tipos celulares es diferente. El tiempo estándar de duración del ciclo celular, reportado para células epiteliales es de 24 horas, en el cual, la fase G1 tienen una duración aproximada de 10-11 horas, mientras que la fase S dura 8-9 horas [46]. Sin embargo, en células tumorales, la duración de cada fase varía dependiendo de la presencia de mutaciones en oncogenes y/o genes supresores de tumores, tipo celular y nutrientes disponibles. En este sentido, se ha reportado que la fase G1 en células de cáncer, tiene una duración más corta, mientras que la fase S se prolonga [47]. Debido a que los ensayos de proliferación miden la incorporación de timidina- (^3H) solo durante la fase de síntesis, se analizó el tiempo al cual, IGF1 promueve la entrada a la fase S de nuestros modelos celulares.

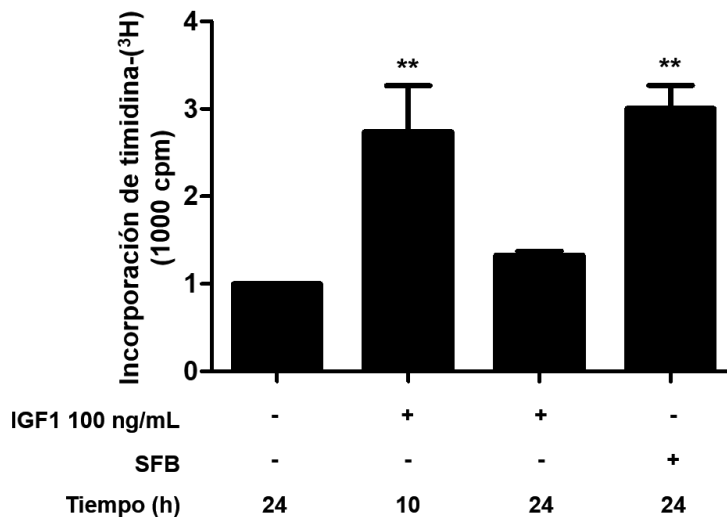
En las células MDA-MB-231, el tiempo de duplicación de la población (TDP), (parámetro basado en el tiempo de duración del ciclo celular completo) es de 38 horas, mientras que para MCF-7 es de 32 horas [43, 44]. No existen reportes concretos que detallen el tiempo que dura cada fase en estos modelos celulares. Por todo lo anterior, se hipotetizó que en células MDA-MB-231, el tiempo de entrada a fase S, tardaría entre 10 y 24 horas después del tratamiento con IGF1. En cambio, en células MCF-7, en las cuales el ciclo celular tiene un tiempo de duración menor que en MDA-MB-231, se hipotetizó que a 10 horas podrían ingresar a fase S, progresando a fase G2 después de 30 horas de tratamiento con IGF1, por lo que estos tiempos fueron empleados.

Cultivos de células MDA-MB-231 y MCF-7, fueron crecidos a 60-70% de confluencia y sometidos a supresión de SFB durante 12-16 horas. Posteriormente fueron tratados con 100 ng/mL de IGF1 durante 10 y 24 horas para MDA-MB-231 y con 50 ng/mL durante 10 y 30 horas para MCF-7. Se les realizó un pulso con 1 μL timidina- (^3H) a 1 $\mu\text{Ci/mL}$ durante 4 horas, finalmente, las células fueron precipitadas y solubilizadas. La incorporación de timidina-

(³H) fue leída en un lector de centelleo líquido, Beckman LSC-6000. Los datos arrojados por el lector de centelleo fueron normalizados a 1000 centelleos por minuto (cpm), comparados contra el control negativo (células sin estímulo) y control positivo (células estimuladas con SFB 5%).

Los resultados indican que el tratamiento con 100 ng/mL de IGF1, es capaz de potenciar la proliferación celular en MDA-MB-231, induciendo la entrada a fase de síntesis 10 horas después del tratamiento. La incorporación de timidina-(³H) se reduce pasadas 24 horas de tratamiento, conforme la progresión del ciclo celular (figura 3, parte superior). Por otro lado, resultados preliminares, muestran que la fase de síntesis en MCF-7 comienza 30 horas después del tratamiento con 50 ng/mL de IGF1, este efecto no es observable a 10 horas de estímulo con 50 ng/mL de IGF1 o con SFB 5% (figura 3, parte inferior).

MDA-MB-231



MCF-7

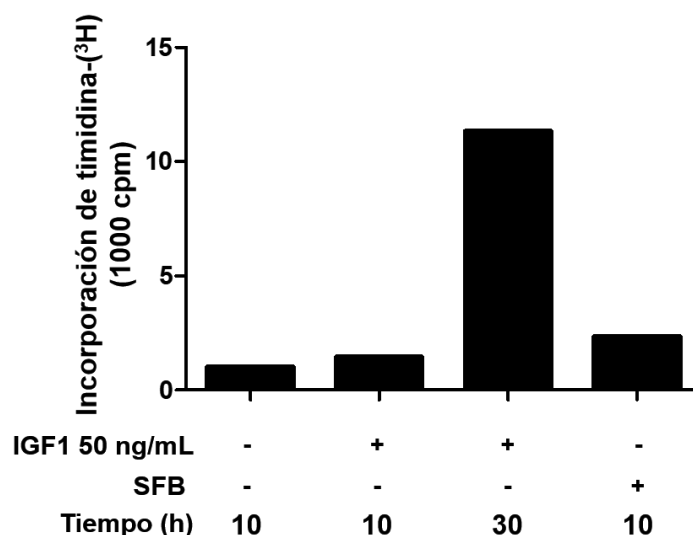


Figura 3. IGF1 induce incremento en la proliferación celular en modelos celulares de cáncer de mama. Cultivos de células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron ayunados y posteriormente estimulados con 100 y 50 ng/mL de IGF1 respectivamente. Diferentes tiempos fueron probados con base en el TDP para cada modelo celular. Los gráficos muestran los datos normalizados a 1000 cpm comparados contra la condición sin estímulo. ** $P < 0.01$.

VI.4. EL pre-tratamiento con AL disminuye la proliferación celular a través del sistema IGF1/IGF1R en células MDA-MB-231

Estudios preliminares indican que los PUFAs ω -6 participan en la regulación de procesos proliferativos, especialmente de células implicadas en metabolismo energético [39, 40, 41]. Por otra parte, IGF1 a través de su receptor IGF1R, tiene un papel importante en el control de la tasa de proliferación y procesos anti-apoptóticos de tumores de epitelio de mama [31, 42]. Sin embargo, la regulación del sistema IGF1/IGF1R mediado por AL no ha sido descrita, especialmente en la tasa de proliferación de células tumorales de mama. Por ello, se evaluó el papel del AL y del sistema IGF1/IGF1R sobre el potencial de proliferación de células MDA-MB-231.

Nuestros resultados anteriores demostraron que la entrada a fase S ante un estímulo con 100 ng/mL de IGF1 es de 10 horas en células MDA-MB-231. Por

tanto, a las 48 horas, las células ingresarían a una segunda fase S, ya que el TDP dura 38 horas en culminar. Una vez conocido estos tiempos, se evaluó el efecto del AL sobre la proliferación celular inducida a través del sistema IGF1/IGF1R. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron tratados con 90 μ M de AL durante 10 horas, 100 ng/mL IGF1 durante 10 o 48 horas, o ambos durante 48 horas. La incorporación de timidina-(3 H) se midió en la primera y segunda fase S (10 y 48 horas). Los datos ilustrados en la figura 4, muestran que 90 μ M/mL de AL durante 10 o 48 horas de tratamiento, no inducen la entrada a fase S de las células MDA-MB-231 (figura 4, c y g). Mientras que, el estímulo con 100 ng/mL de IGF1 promueve baja incorporación de timidina-(3 H) a 10 horas de estimulación (figura 4, b). Por el contrario, la incorporación de timidina-(3 H) se triplica en el segundo ciclo celular de las células MDA-MB-231 (figura 4, f). Sin embargo, cuando las células son pre-tratadas 10 horas con 90 μ M/mL de AL previas al estímulo con 100 ng/mL de IGF1, la incorporación de timidina-(3 H) es casi el doble en comparación con el control negativo (figura 4, e), pero no en comparación con células que recibieron un tratamiento con 100 ng/mL de IGF1 durante 48 horas (figura 4, e vs. f). Para demostrar que el efecto mostrado en la condición “e” esta regulado por el pre-tratamiento con 90 μ M/mL de AL, se realizaron co-estímulos de 90 μ M/mL de AL + 100 ng/mL de IGF1 durante 48 horas, en donde se observa baja incorporación de timidina-(3 H) (figura 4, d). Los datos obtenidos por el lector de centelleo fueron normalizados a 1000 cpm, comparados con el control negativo (células sin estímulo) y control positivo (células estimuladas con SFB 5%).

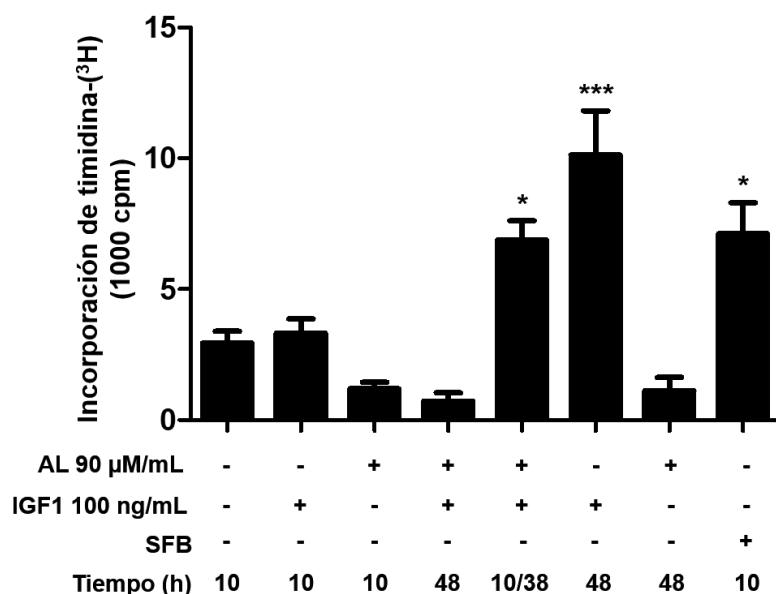


Figura 4. La activación del sistema IGF1/IGF1R con IGF1, favorecen que el pre-tratamiento con AL sea un agente proliferativo en células MDA-MB-231. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron ayunados y posteriormente estimulados con 90 μ M/mL de AL, 100 ng/mL de IGF1 o ambos. La gráfica muestra los datos del registro de 1000 cpm, normalizados contra la condición sin estímulo, correspondientes a 2 experimentos independientes. Condiciones utilizadas, de izquierda a derecha: **a)** control negativo (células sin estímulo), **b)** 100 ng/mL de IGF1 por 10 horas, **c)** 90 μ M/mL de AL por 10 horas, **d)** co-estímulo de 90 μ M/mL de AL + 100 ng/mL de IGF durante 48 horas, **e)** 90 μ M/mL de AL por 10 horas + 100 ng/mL de IGF por 38 horas, **f)** 100 ng/mL de IGF1 por 48 horas, **g)** 90 μ M/mL de AL por 48 horas y **h)** control positivo (SFB 5%). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

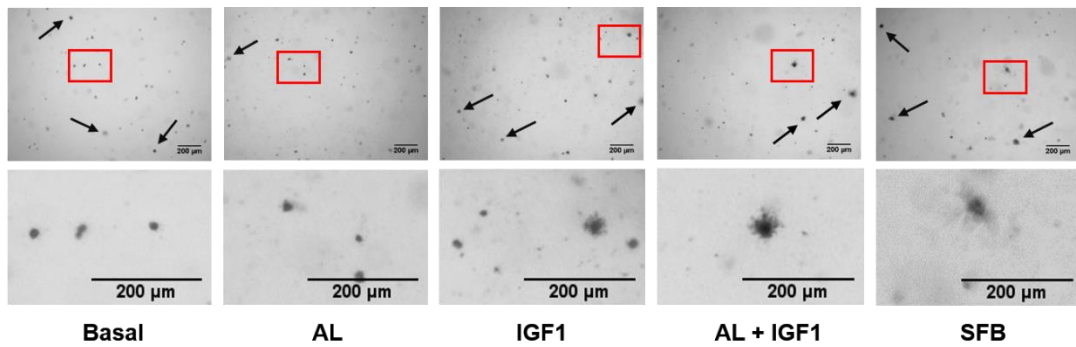
VI.5. El pre-tratamiento con AL favorece la formación de colonias inducida IGF1/IGF1R en células MDA-MB-231.

Para fortalecer los resultados encontrados en la figura 4, se realizaron ensayos de formación de colonias en agar suave. En la figura 5, se muestran los resultados correspondientes a las colonias de células MDA-MB-231 y MCF-7 formadas en respuesta al estímulo con 90 de μ M/mL AL, 100 o 50 ng/mL de IGF1 o ambos. En las células MDA-MB-231, el número de colonias no cambia significativamente en ninguna de las condiciones probadas, sin embargo, el tamaño de las colonias es mayor cuando las células reciben un pre-tratamiento con 90 de μ M/mL AL y estímulo con 100 ng/mL de IGF1, en comparación con las células tratadas con 100 ng/mL o SFB. En cambio, los resultados de un

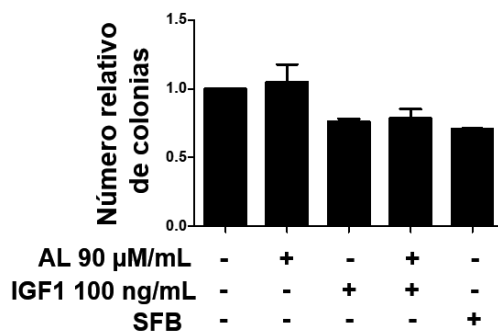
experimento independiente en las células MCF-7, indican que el mayor número de colonias formadas se observó en la condición que recibió un tratamiento con 50 ng/mL de IGF1. El pre-tratamiento con 90 de $\mu\text{M}/\text{mL}$ AL no indujo incremento en el número de colonias en este modelo celular, aunque las colonias formadas, eran de tamaño similar a las colonias formadas en respuesta a 100 ng/mL de IGF1. De acuerdo con los resultados obtenidos por los ensayos de proliferación por incorporación de timidina- (^3H) (figura 4) se encontró que el AL, a través del sistema IGF1/IGF1R participan en la formación de colonias de células MDA-MB-231, pero no en MCF-7 (figura 5).

MDA-MB-231

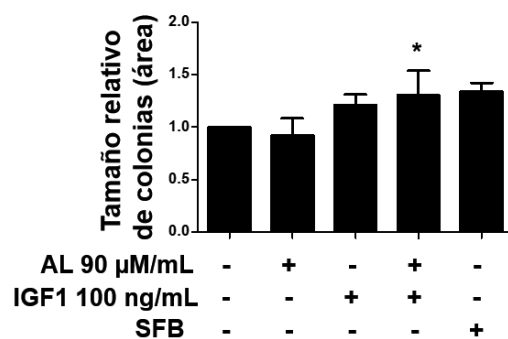
A



B

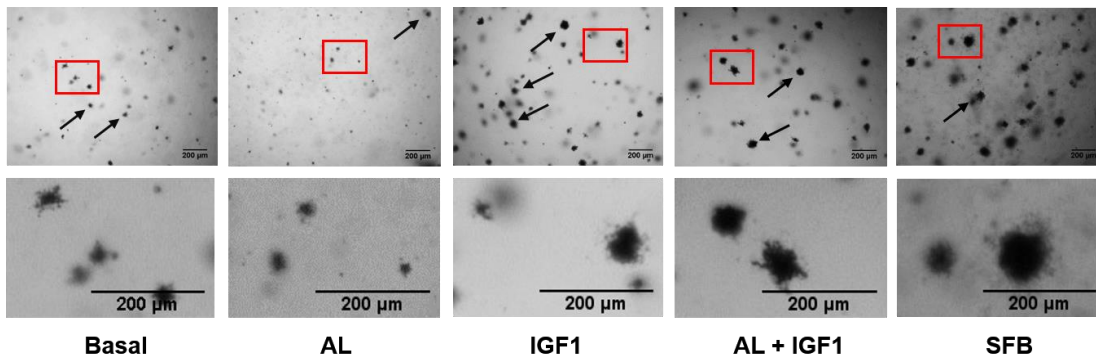


C

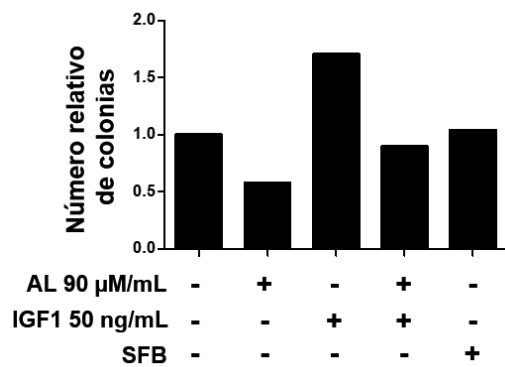


MCF-7

A



B



C

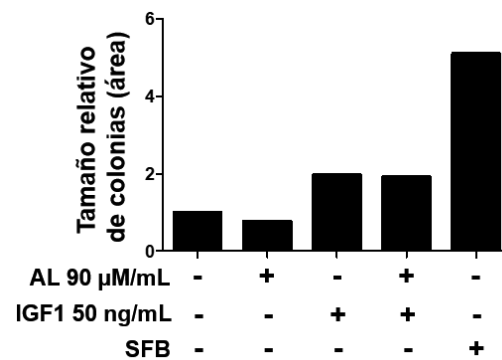


Figura 5. El AL, mediante el sistema IGF1/IGF1R, participa en la formación de colonias de células de cáncer de mama con diferentes grados de transformación. Células MDA-MB-231 (figura superior) y MCF-7 (figura inferior) fueron ayunadas y contabilizadas. 1×10^4 células se plaquearon para cada condición, posteriormente se estimularon con $90 \mu\text{M/mL}$ de AL o IGF1 (100 ng/mL para MDA-MB-231 y 50 ng/mL para MCF-7) durante 3 semanas con cambio de estímulo cada 3 días. **A.** Imágenes representativas de las colonias formadas en cada condición de 2 experimentos independientes para MDA-MB-231 (superior) y uno para MCF-7 (inferior), tomadas a un objetivo 4x. Las flechas negras señalan algunas colonias de células formadas en cada condición. Las áreas marcadas en cuadros rojos fueron amplificadas 200%, mostradas debajo de cada imagen a 4x. La barra de escalas corresponde a un tamaño de $200 \mu\text{m}$. **B.** Gráfico correspondiente al conteo de colonias. **C.** Gráfico correspondiente al tamaño de colonias. * $P < 0.05$.

V.6. El pre-tratamiento con AL incrementa el potencial migratorio en células de cáncer de mama, mediado por el sistema IGF1/IGF1R.

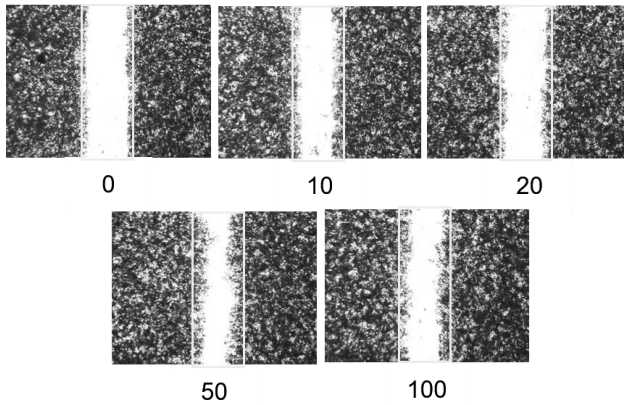
Los resultados previos, indican que IGF1 es capaz de inducir proliferación y migración celular en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 (figura 2 y 3). El pre-tratamiento con AL, estimula la tasa de proliferación, a través del sistema IGF1/IGF1R, comparado con células que no reciben el pre-estímulo. En este contexto, se evaluó el efecto que tienen el AL sobre el potencial migratorio mediado por IGF1, para lo cual, se llevaron a cabo ensayos de migración por cierre de herida. En las figuras 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, respectivamente.

Los tratamientos individuales con 90 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de AL o 100 ng/mL de IGF1 promueven un mínimo efecto en el proceso migratorio en células MDA-MB-231. Este patrón migratorio incrementa cuando las células reciben un pre-tratamiento con 90 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de AL y son retadas con 100 ng/mL de IGF1. Las condiciones fueron comparadas contra el control negativo (células sin estímulo). Como control positivo, se utilizaron células estimuladas con SFB 5% (figura 6).

Por otra parte, resultados preliminares indican que la línea celular MCF-7 tiene un comportamiento similar, puesto que el pre-tratamiento con 90 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de AL incrementan el potencial migratorio en comparación con las células que no reciben el tratamiento. Este potencial migratorio se ve disminuido cuando se utiliza un inhibidor específico para IGF1R (PPP). PPP también es capaz de disminuir la migración de células MCF-7 inducida por el pre-estímulo con 90 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de AL y 50 ng/mL de IGF1. La eficiencia de inhibición fue comprobada con las condiciones donde se estimuló con 50 ng/mL de IGF1 + 250 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de PPP y solo con PPP (figura 7).

MDA-MB-231

A



B

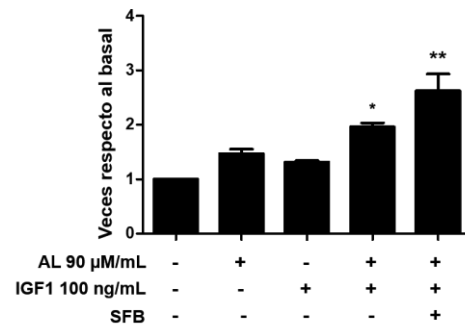
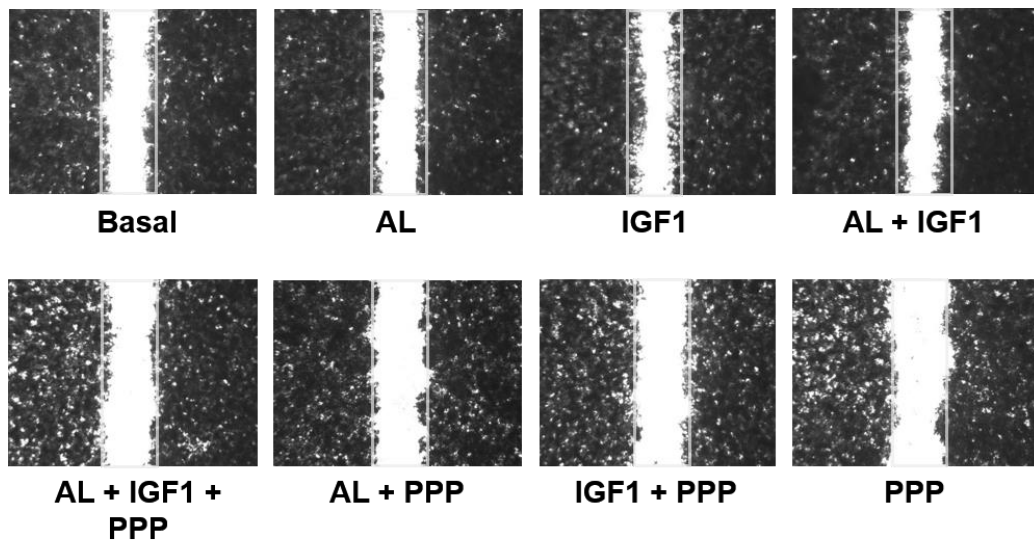


Figura 6. El pre-tratamiento con AL incrementa el perfil migratorio de células MDA-MB-231 a través del sistema IGF1/IGF1R. Células MDA-MB-231 fueron sometidas a supresión de SFB, posteriormente fueron tratadas con 90 μM/mL de AL, 100 ng/mL de IGF1 o ambos, durante 48 horas. **A.** Imágenes representativas del cierre de herida, correspondientes a cada condición. **B.** Análisis densitométrico y estadístico de dos experimentos independientes.* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

MCF-7

A



B

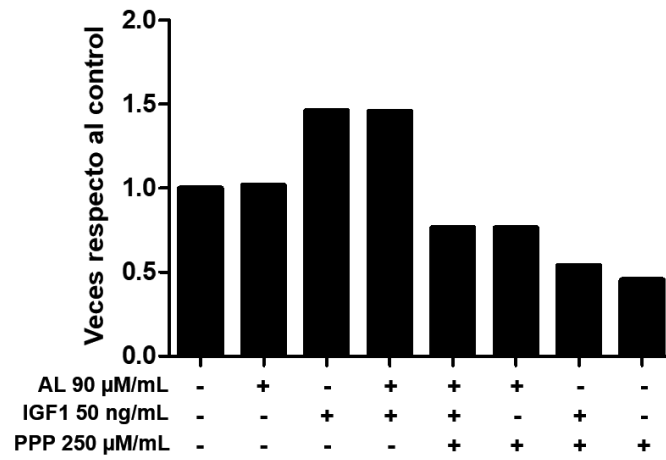


Figura 7. El pre-tratamiento con AL favorece el proceso migratorio de células MCF-7 a través del sistema IGF1/IGF1R. Cultivos de células MCF-7 fueron sometidas a supresión de SFB, posteriormente fueron tratadas con 90 μ M/mL de AL, 100 ng/mL de IGF1 o ambos, durante 48 horas. **A.** Imágenes representativas del cierre de herida, correspondientes a cada condición. **B.** Análisis densitométrico de un experimento independiente.

VII. DISCUSIÓN

La incidencia de casos de obesidad, DM2 y cáncer de mama, crece anualmente en países desarrollados y en vías de desarrollo. Diversos estudios han vinculado a los AGs, producto de las dietas, con el riesgo de adquirir estas patologías. Esta relación surge a partir de datos arrojados por estudios epidemiológicos y clínicos, que indican que durante la obesidad y DM2 frecuentemente se presentan estados crónicos de hiperlipidemia, hiperinsulinemia y elevadas concentraciones de IGF1 libre [19, 27, 28]. La coexistencia de estas tres sustancias, ha llevado a hipotetizar la existencia de ejes de comunicación entre ellas, que podrían modular los eventos biológicos implicados en el inicio y progresión tumoral. En este contexto, recientemente se reportó que en células tumorales de epitelio de mama, el AL puede regular migración e invasión celular, con sobreexpresión de los receptores a insulina [42]. Por otro lado, en células de cáncer de colon, el sistema IGF1/IGF1R se hiperactiva en respuesta a pre-tratamientos con PUFAs provenientes de la dieta [54]. Por lo que, en el presente estudio se evaluó el efecto del AL, el PUFA de mayor consumo en dietas occidentales, sobre los eventos biológicos modulados por IGF1 y su receptor en células de cáncer de mama con diferentes grados de invasividad.

Previamente, en nuestro equipo de trabajo, se demostró que 90 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de AL induce migración celular a través de la activación de FFAR4, en células de cáncer de mama [29]. En este estudio, se demostró que el AL a una concentración de 90 $\mu\text{M}/\text{mL}$, es capaz de inducir el incremento en la expresión de IGF1R en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. A diferencia de nuestros hallazgos, Seti y colaboradores en el año 2009, demostraron que en células de cáncer de colon, la expresión total del receptor IGF1R, en respuesta a 0.3 o 2 mM de AL, no se ve alterada. No obstante, los niveles de fosforilación de IGF1R incrementan 75% en respuesta al estímulo con 0.3 mM de AL, efecto que no se observa en células que no reciben un tratamiento con AL [54]. Estos

datos en conjunto, sugieren que en células cancerosas, el efecto del AL sobre la expresión de IGF1R depende del tipo celular y la dosis de estímulo.

El sistema IGF1/IGF1R participa activamente en la regulación de procesos mitogénicos y antiapoptóticos de células implicadas en la homeostasis energética, aunque frecuentemente se encuentra asociado con etapas iniciales y finales de la metástasis de células cancerosas. La regulación de la motilidad celular es necesaria durante la metástasis, lo cual conlleva cambios en la arquitectura del citoesqueleto de las células tumorales. No obstante, una vez que estas células colonizan órganos distantes, los procesos proliferativos toman mayor importancia en el crecimiento del nuevo tumor [55]. De acuerdo con los resultados del presente estudio, IGF1 induce migración celular en células MDA-MB-231 y MCF-7, evento que depende de la concentración. Datos previos, señalan que 10 ng/mL de IGF1 induce rápida y continua reorganización de fibras de estrés, a tiempos cortos, en células MDA-MB-231; mientras que la línea celular MCF-7, el estímulo con 10 ng/mL de IGF1, requiere de mayor tiempo para la formación de estructuras motiles. Este fenómeno, se atribuyó al potencial de activación de la cinasa Src en respuesta a IGF1, la cual, está implicada en la rápida fosforilación y traslocación de cortactina hacia la membrana plasmática, en donde contribuye en la formación de contactos focales [43]. Con estos datos, se sugiere que en células con potencial migratorio intrínseco, como es el caso de la línea celular MDA-MB-231, Src mantiene un estado de activación basal que se incrementa ante el estímulo con IGF1, incluso con dosis bajas en tiempos cortos. Lo cual se refleja en la migración celular gradual ante concentraciones crecientes de IGF1, alcanzando el máximo efecto, en términos de motilidad, a 100 ng/mL en células MDA-MB-231. Por otro lado, las células MCF-7 requieren de mayor tiempo para formar las estructuras motiles ante dosis bajas de IGF1, evento que se agiliza al incrementar la concentración. En este estudio, se demostró que con 50 ng/mL de IGF1, las células MCF-7 son capaces de potenciar su perfil migratorio.

Por otra parte, este estudio demuestra, de igual manera, que 100 ng/mL de IGF1 incrementa la tasa de proliferación celular de células MDA-MB-231. Así como, después de 10 horas de tratamiento con 100 ng/mL de IGF1, las células se encuentran en fase S, progresando a fase G2 pasadas 24 horas. El primer ciclo celular culmina después de 38 horas de iniciado el tratamiento con IGF1, de tal manera que a las 48 horas de estímulo, ingresan nuevamente a fase S, iniciando un nuevo ciclo celular. Con lo anterior, demostramos que IGF1 a una concentración de 100 ng/mL, favorece la progresión del ciclo celular de células MDA-MB-231, sin alterar su duración, ya que, la ATCC reporta que el TDP para este modelo celular es de 38 horas, concordando con nuestros datos [48]. Davison y colaboradores en el año 2011 demostraron que en modelos celulares de cáncer de mama triple negativos, el porcentaje de DNA incrementa exponencialmente en respuesta al tratamiento con 50 ng/mL de IGF1, induciendo proliferación, siendo la línea celular MDA-MB-231, en donde la tasa de proliferación es más alta, sin embargo, la duración del ciclo celular no fue estudiada [52]. En contraste, resultados preliminares sugieren que en la línea celular MCF-7, 50 ng/mL de IGF1 podrían disminuir el tiempo de duración del ciclo celular. El modelo celular MCF-7 tarda 32 horas en culminar un ciclo celular en respuesta a un mitógeno [49], sin embargo, ante el estímulo con 50 ng/mL de IGF1 durante 30 horas, estas células muestran un incremento en la incorporación de timidina-(3H), lo cual indica que se encuentran en fase S posiblemente del segundo ciclo celular. Sin embargo, se requieren realizar más mediciones, a tiempos más cortos, que comprueben esta hipótesis.

Los mecanismos regulatorios del sistema IGF1/IGF1R, son múltiples y actúan a diferentes niveles [16, 35]. La sobreexpresión del receptor a IGF1, inducida por el AL, en células MDA-MB-231 y MCF-7, es un indicio de la existencia de un eje de regulación entre estas moléculas. Esta hipótesis fue comprobada utilizando pre-tratamientos con 90 μ M/mL de AL, seguido de la estimulación con 100 ng/mL de IGF1.

Nuestros resultados muestran que los eventos celulares regulados por el sistema IGF1/IGF1R, son intensificados por los pre-tratamientos con AL en células MDA-MB-231. Particularmente, los efectos sobre la motilidad celular y el crecimiento de colonias modulados por IGF, fueron potenciados tras recibir un pre-tratamiento con AL en el modelo celular MDA-MB-231. No obstante, la tasa de proliferación no mostró la misma tendencia. Este fenómeno podría ser explicado por la naturaleza de los ensayos utilizados, puesto que, el crecimiento de colonias se efectuó en un entorno independiente de anclaje, mientras que la incorporación de timidina-(3H) se realizó en células sembradas sobre una matriz sólida [56].

Interesantemente, en la línea celular MCF-7, el AL no induce formación de colonias ni migración celular. En cambio, los efectos propios del sistema IGF1/IGF1R sobre migración, proliferación celular y crecimiento de colonias de estas células son significativamente mayores, independientemente del pre-tratamiento con AL. Las diferencias en la regulación de los mismos eventos celulares en el modelo celular MDA-MB-231 y MCF-7, podría deberse a la regulación genómica y no genómica mediada por el AL, IGF1R y el receptor de estrógenos, progesterona y sobreexpresión de HER2. Recientemente, se reportó que el receptor IGF1R, tras su activación, puede translocarse a núcleo en donde participa como co-activador de genes que son regulados por el receptor de estrógenos. En presencia de receptores a estrógenos, IGF1R nuclear, compite por los sitios de unión a factores de transcripción implicados en la progresión del ciclo celular. En este sentido, en el modelo celular MDA-MB-231, que carece de la expresión de receptores a estrógenos, IGF1R regularía totalmente los genes blanco del receptor a estrógenos, a diferencia de la línea celular MCF-7 [57].

Con todo lo anterior, se propone que, en células MDA-MB-231 el AL, mediante una vía no genómica regulada por FFAR1 o FFAR4, activaría los receptores IGF1R en membrana que son expresados de manera basal, los cuales al translocarse a núcleo autoregularían su expresión, así como la expresión de

genes implicados en la progresión del ciclo celular y migración celular. Esto podría explicar el incremento en la expresión de IGF1R, así como el incremento en la tasa de migración, proliferación y crecimiento celular observado en células pre-tratadas con IGF1. Por el contrario, en células MCF-7, el efecto del AL sobre el sistema IGF1/IGF1R estaría limitado a los receptores expresados en membrana, es decir, a una vía no genómica. Mientras que la maquinaria genómica estaría regulada por receptores a estrógenos, por tal motivo, los efectos de los pre-tratamientos con AL, no incrementan significativamente los efectos del sistema IGF1/IGF1 al ser retados con IGF1.

Estos resultados demuestran la importancia de las dietas ricas en AGs, durante la regulación de procesos tumorales, que conllevan a la adquisición de un fenotipo mayormente agresivo.

VIII. CONCLUSIÓN

El sistema IGF1/IGF1R participa activamente en procesos proliferativos y migratorios de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

El pre-tratamiento con AL induce incremento en la expresión de receptores a IGF1 en células MDA-MB-231 y MCF-7. Este incremento no altera los eventos biológicos propios del IGF1/IGF1R en células MCF-7, mientras que en MDA-MB-231 incrementa la tasa de proliferación y migración.

IX. PERSPECTIVAS

- Analizar el perfil de expresión y activación del receptor a IGF1 en membrana, citoplasma y núcleo en respuesta a los pre-tratamientos con AL y estímulos con IGF1 en células de cáncer de mama.
- Estudiar el efecto del AL sobre la señalización modulada por el sistema IGF1/IGF1R en células de cáncer de mama positivas y negativas a receptores de estrógenos, progesterona y HER2.
- Conocer el efecto de los pre-tratamientos con AL sobre la activación de genes regulados por el sistema IGF1/IGF1R en células de cáncer de mama con diferentes grados de invasividad.
- Estudiar el papel del IGF1 en procesos de invasión y supervivencia de células cancerosas mamarias.
- Evaluar el efecto de metabolitos del AL sobre la actividad del sistema IGF1/IGF1R en células de cáncer de mama.

X. REFERENCIAS

- [1] F. Hassiotou and D. Geddes, "Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge," *Clin. Anat.*, vol. 26, no. 1, pp. 29–48, 2013.
- [2] S. Pandya and R. G. Moore, "Breast development and anatomy," *Clin. Obstet. Gynecol.*, vol. 54, no. 1, pp. 91–95, 2011.
- [3] K. Polyak, "Science in medicine Breast cancer : origins and evolution," *Cell*, vol. 117, no. 11, pp. 3155–63, 2007.
- [4] American Cancer Society, "Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018," *Breast Cancer Facts Fig.*, pp. 1–44, 2017.
- [5] M. Ghoncheh, Z. Pournamdar, and H. Salehiniya, "Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 17, pp. 43–46, 2016.
- [6] INEGI, "Estadísticas a Propósito Del Día Mundial De La Lucha Contra El Cáncer De Mama (19 De Octubre)," *Inegi*, 2015. .
- [7] A. Mehrgou and M. Akouchekian, "The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development," *Med. J. Islam. Repub. Iran*, pp. 1–12, 2016.
- [8] M. F. Rimawi, P. B. Shetty, H. L. Weiss, R. Schiff, C. K. Osborne, G. C. Chamness, and R. M. Elledge, "Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes," *Cancer*, vol. 116, no. 5, pp. 1234–1242, 2010.
- [9] I. Thune and A.-S. Furberg, "Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 33, no. Supplement, pp. S530–S550, 2001.
- [10] Y. Liu and N. Nguyen, "Links Between Alcohol Consumption and Breast Cancer," vol. 11, pp. 65–77, 2015.
- [11] C. W. Welsch, "Relationship between dietary fat and experimental

mammary tumorigenesis. A review and critique,” vol. 52, no. 132, p. 2040S–2048S, 1992.

- [12] A. Soto-Guzman, T. Robledo, M. Lopez-Perez, and E. P. Salazar, “Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 294, no. 1–2, pp. 81–91, 2008.
- [13] S. Villegas-Comonfort, R. Castillo-Sanchez, N. Serna-Marquez, P. Cortes-Reynosa, and E. P. Salazar, “Arachidonic acid promotes migration and invasion through a PI3K/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells,” *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 90, no. 5, pp. 169–177, 2014.
- [14] E. Giovannucci, D. M. Harlan, M. C. Archer, R. M. Bergenstal, S. M. Gapstur, L. A. Habel, M. Pollak, J. G. Regensteiner, and D. Yee, “Diabetes and cancer: A consensus report,” *Diabetes Care*, vol. 33, no. 7, pp. 1674–1685, 2010.
- [15] E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond, and M. J. Thun, “Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults,” *J. Med.*, pp. 1625–1638, 2003.
- [16] E. E. Calle and R. Kaaks, “Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 8, pp. 579–591, 2004.
- [17] M. Gerber, “Re: Reversal of relation between body mass and endogenous estrogen concentrations with menopausal status [4],” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 89, no. 9, pp. 661–662, 1997.
- [18] M. Hernández-Ávila, J. P. Gutiérrez, and N. Reynoso-Noverón, “Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia,” *Salud Publica Mex.*, vol. 55, no. 1, pp. s129–s136, 2013.
- [19] D. H. Cohen and D. LeRoith, “Obesity, type 2 diabetes, and cancer: The

- insulin and IGF connection,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 19, no. 5, pp. 27–45, 2012.
- [20] G. Soto-estrada, L. M. Altamirano, J. J. García-garcía, I. O. Moreno, and M. Silberman, “Trends in frequency of type 2 diabetes in Mexico and its relationship to dietary patterns and contextual factors,” *Gac. Sanit.*, no. xx, pp. 1–8, 2017.
- [21] A. C. Rustan and C. A. Drevon, “Fatty Acids: Structures and Properties,” *Encycl. Life Sci.*, pp. 1–7, 2005.
- [22] T. Hara, D. Kashihara, A. Ichimura, I. Kimura, G. Tsujimoto, and A. Hirasawa, “Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1841, no. 9, pp. 1292–1300, 2014.
- [23] J. Miyamoto, S. Hasegawa, M. Kasubuchi, A. Ichimura, A. Nakajima, and I. Kimura, “Nutritional signaling via free fatty acid receptors,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 4, pp. 1–12, 2016.
- [24] V. Chajès, G. Torres-Mejía, C. Biessy, C. Ortega-Olvera, A. Angeles-Llerenas, P. Ferrari, E. Lazcano-Ponce, and I. Romieu, “ ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acid intakes and the risk of breast cancer in Mexican women: Impact of obesity status,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 21, no. 2, pp. 319–326, 2012.
- [25] M. MacLennan and D. W. L. Ma, “Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer,” *Breast Cancer Res.*, vol. 12, no. 5, pp. 1–10, 2010.
- [26] R. J. Jandacek, “Linoleic Acid: A Nutritional Quandary,” *Healthcare*, vol. 5, no. 2, p. 25, 2017.
- [27] Y. Zhou, T. Wang, S. Zhai, W. Li, and Q. Meng, “Linoleic acid and breast cancer risk: A meta-analysis,” *Public Health Nutr.*, vol. 19, no. 8, pp. 1457–1463, 2016.

- [28] C. Blücher and S. C. Stadler, "Obesity and breast cancer: Current insights on the role of fatty acids and lipid metabolism in promoting breast cancer growth and progression," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 8, no. OCT, pp. 1–7, 2017.
- [29] N. Serna-Marquez, S. Villegas-Comonfort, O. Galindo-Hernandez, N. Navarro-Tito, A. Millan, and E. P. Salazar, "Role of LOXs and COX-2 on FAK activation and cell migration induced by linoleic acid in MDA-MB-231 breast cancer cells," *Cell. Oncol.*, vol. 36, no. 1, pp. 65–77, 2013.
- [30] N. Reyes, I. Reyes, R. Tiwari, and J. Geliebter, "Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D," *Cancer Lett.*, vol. 209, no. 1, pp. 25–35, 2004.
- [31] M. D. Jensen, M. W. Haymond, R. A. Rizza, P. E. Cryer, and J. M. Miles, "Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity.," *J. Clin. Invest.*, vol. 83, no. 4, pp. 1168–73, 1989.
- [32] G. Boden, X. Chen, J. Ruiz, J. V. White, and L. Rossetti, "Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake," *J. Clin. Invest.*, vol. 93, no. 6, pp. 2438–2446, 1994.
- [33] B. Guenther, "Obesity and Free Fatty Acid (FFA)," *Acta Med. Scand.*, vol. 185, no. 6, pp. 351–356, 2008.
- [34] N. Sattar and J. M. R. Gill, "Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat?," *BMC Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–6, 2014.
- [35] C. Gupta and K. Tikoo, "High glucose and insulin differentially modulates proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 51, no. 1, pp. 119–129, 2013.
- [36] M. N. Pollak, E. S. Schernhammer, and S. E. Hankinson, "Insulin-like growth factors and neoplasia," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 7, pp. 505–518, 2004.
- [37] P. Singh, J. M. Alex, and F. Bast, "Insulin receptor (IR) and insulin-like

growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: Novel treatment strategies for cancer,” *Med. Oncol.*, vol. 31, no. 1, 2014.

- [38] E. M. Bailyes, B. T. Navé, M. A. Soos, S. R. Orr, A. C. Hayward, and K. Siddle, “Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting,” *Biochem. J.*, vol. 327 (Pt 1, pp. 209–15, 1997.
- [39] M. Federici, O. Porzio, L. Zucaro, B. Giovannone, P. Borboni, M. A. Marini, D. Lauro, and G. Sesti, “Increased abundance of insulin/IGF-I hybrid receptors in adipose tissue from NIDDM patients,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 135, no. 1, pp. 41–47, 1997.
- [40] P. F. Christopoulos, P. Msaouel, and M. Koutsilieris, “The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer,” *Mol. Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–14, 2015.
- [41] R. Bhargava, S. Beriwal, K. McManus, and D. J. Dabbs, “Insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-1R) expression in normal breast, proliferative breast lesions, and breast carcinoma,” *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, vol. 19, no. 3, pp. 218–225, 2011.
- [42] C. Rodriguez-Monterrosas, R. Diaz-Aragon, P. Cortes-Reynosa, and E. P. Salazar, “Linoleic acid induces an increased response to insulin in MDA-MB-231 breast cancer cells,” *J. Cell. Biochem.*, no. November 2016, 2018.
- [43] S. Mezi, L. Todi, E. Orsi, A. Angeloni, and P. Mancini, “Involvement of the Src-cortactin pathway in migration induced by IGF-1 and EGF in human breast cancer cells,” *Int. J. Oncol.*, vol. 41, no. 6, pp. 2128–2138, 2012.
- [44] G. A. Romar, T. S. Kupper, and S. J. Divito, “Research techniques made simple: Techniques to assess cell proliferation,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 136, no. 1, pp. e1–e7, 2016.

- [45] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, and L. Minor, "Cell Viability Assays," *Assay Guid. Man. [Internet]*, vol. 114, no. 8, pp. 785–796, 2013.
- [46] G. M. Cooper., *The Cell: A molecular approach*, 2nd editio. Boston University, 2000.
- [47] D. M. Prescott and D. Ph, "Biology of Cancer and the Cancer Cell : Normal and Abnormal Regulation of Cell Reproduction," 1968.
- [48] A. Htb-, "Breast Adenocarcinoma," vol. 26, pp. 1–25, 2012.
- [49] P. Sheet, "Mcf7 (atcc ® htb-22™)," pp. 3–5.
- [50] N. Habermann, B. Christian, B. Luckas, B. L. Pool-Zobel, E. K. Lund, and M. Glej, "Effects of fatty acids on metabolism and cell growth of human colon cell lines of different transformation state," *BioFactors*, vol. 35, no. 5, pp. 460–467, 2009.
- [51] J. Stewart, D. Johnson, E. B. May, and R. Westleyll, "Role of Insulin-like Growth Factors and the Type I Insulin-like Growth Factor Receptor in the Estrogen-stimulated Proliferation Human Breast Cancer Cells *," vol. 265, no. 34, pp. 21172–21178, 1990.
- [52] Z. Davison, G. E. de Blacquièrè, B. R. Westley, and F. E. B. May, "Insulin-like Growth Factor-Dependent Proliferation and Survival of Triple-Negative Breast Cancer Cells: Implications for Therapy," *Neoplasia*, vol. 13, no. 6, pp. 504–515, 2011.
- [53] E. P. Salazar, L. Castro-sanchez, P. Cortes-Reynosa, and E. P. Salzar, "Signal Transduction Pathways Mediated by Unsaturated Free Fatty Acids in Breast Cancer Cells," *Cancer Res.*, vol. 61, pp. 684–703, 2001.
- [54] H. Seti, A. Leikin-Frenkel, and H. Werner, "Effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on IGF-I receptor signalling in colorectal cancer cells," *Arch. Physiol. Biochem.*, vol. 115, no. 3, pp. 127–136, 2009.

- [55] F. Van Zijl, G. Krupitza, and W. Mikulits, "Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration," *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, vol. 728, no. 1–2, pp. 23–34, 2011.
- [56] Y. Imamura, T. Mukohara, Y. Shimono, Y. Funakoshi, N. Chayahara, M. Toyoda, N. Kiyota, S. Takao, S. Kono, T. Nakatsura, and H. Minami, "Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer," *Oncol. Rep.*, vol. 33, no. 4, pp. 1837–1843, 2015.
- [57] R. Sarfstein and H. Werner, "Minireview: Nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: A novel paradigm in signal transduction," *Endocrinology*, vol. 154, no. 5, pp. 1672–1679, 2013.