



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

Unidad Zacatenco

Departamento de Biología Celular

**Participación de la vía PI3K/Akt2 en el proceso de transición epitelio-  
mesénquima inducido por vesículas extracelulares derivadas de  
células MDA-MB-231 estimuladas con ácido linoleico o IGF-1**

Tesis que presenta

**M. en C. Elizabeth Leal Orta**

Para obtener el grado de

**Doctora 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 del presente trabajo se contó con una beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante el período del 01 de agosto de 2016 al 31 de julio de 2020, con número de registro 627440.

Este trabajo contó con el apoyo económico de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), otorgado para el proyecto 255429. Así como de CONACYT-FOSISS (Salud 2015-1-261637).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar, por permitirme trabajar con su grupo de investigación, además por su asesoría, atención y sugerencias durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, al Dr. José Efraín Garrido Guerrero, al Dr. José Manuel Hernández Hernández y a la Dra. Norma Velázquez Guadarrama, por su disponibilidad y asesoría en la revisión de esta tesis.

A todos los miembros del laboratorio 42.

A Nora Araceli Ruíz Durán por su amabilidad y apoyo técnico en el laboratorio. Al auxiliar del laboratorio Dr. Pedro Cortés Reynosa por su asesoría brindada.

A Clara Hernández Chávez por su ayuda administrativa.

A mis amigos agradezco el apoyo, cariño, ánimo y momentos agradables que hemos compartido.

## DEDICATORIA

Especialmente y con mucho cariño para mi mami Cuquis, por ser un excelente ejemplo de fuerza y valentía, por brindarme todo su amor, comprensión, apoyo incondicional, por creer en mí y sobre todo por ser un ejemplo de vida a seguir.

Siempre presente en mis pensamientos y en mi corazón, te amo.

A mi papá Víctor Leal Bueno, gracias por tu cariño, apoyo, creer en mí, los sabios consejos y por orientarme hacia un buen futuro. Agradezco mucho que estés a mi lado, te amo.

A mis hermanas Sandy, Jessy y Vicky quienes me han brindado apoyo incondicional, amor, comprensión, paciencia, alegría, motivación, consejos y palabras de aliento. En gran parte gracias a ustedes hoy puedo ver alcanzada mi meta, admiro su fortaleza y gracias por su ejemplo de superación y entrega. Mil palabras no bastarían para agradecerles todo lo que me han dado.

Soy muy feliz por tenerlas como hermanas y amigas, las amo.

A mis sobrinitos Vick y Santi quienes me hacen muy feliz y forman parte de mi motor de vida.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
Glándula mamaria .....	4
Cáncer de mama .....	4
Epidemiología .....	6
Factores de riesgo .....	7
Factores genéticos.....	7
Factores reproductivos y hormonales .....	7
Factores relacionados con el estilo de vida.....	8
Ácido linoleico (AL) y cáncer de mama .....	8
Obesidad y sobrepeso .....	9
Generalidades del IGF-1.....	10
Sistema de IGFs .....	11
Receptores y transducción de señal mediadas por IGFs.....	12
Participación de IGF-1 e IGF-1R en el desarrollo de la glándula mamaria y en cáncer.....	14
PI3K/Akt.....	16
MAPK/ERK1/2 .....	17
TEM .....	19
Vesículas extracelulares.....	21
VEs y cáncer .....	23
JUSTIFICACIÓN .....	26

HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVO GENERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
Anticuerpos y reactivos.....	28
Cultivos celulares.....	28
Estimulación de células MDA-MB-231 con IGF-1 .....	29
Estimulación de células MDA-MB-231 con AL.....	29
Aislamiento de VEs mediante centrifugación diferencial .....	29
Microscopia electrónica de transmisión (MET) .....	30
Estimulación de células MCF10A con VEs aisladas de células MDA-MB-231 ..	30
Inmunoprecipitación.....	31
Inmunodetección .....	31
PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR).....	32
Ensayo de migración .....	32
Zimografía en gelatina .....	33
Ensayo de invasión.....	34
Microscopia confocal de inmunofluorescencia.....	34
Ensayo de captura de VEs mediante microscopia confocal .....	35
Ensayo de captura de VEs mediante citometría de flujo .....	35
ARN de interferencia .....	36
Análisis estadístico .....	36
RESULTADOS.....	37
I. Resultados de VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 .....	37

IGF-1 induce migración de células MDA-MB-231 y MCF10A .....	37
VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen migración de células MFC10A .....	39
VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 regulan la expresión de E-cadherina y N-cadherina.....	41
VEs de células MDA-MB-231 estimuladas IGF-1 inducen la expresión de los represores transcripcionales de E-cadherina .....	43
VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 incrementan la expresión de vimentina.....	45
VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen un incremento de la secreción de la MMP-9 e invasión.....	47
VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen migración a través de ERK1/2 .....	49
VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen migración a través de Akt .....	51
Las VEs liberadas de células MDA-MB-231 sin tratamiento y estimuladas con IGF-1 son capturadas por las células MCF10A.....	53
<b>II. Resultados de VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL55</b>	
VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la activación de Akt2 .....	55
La actividad de PI3K es requerida para la activación de Akt2 inducida por las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL.....	57
Participación de la vía PI3K/Akt1/2 en la migración inducida por VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL .....	59
Papel de Akt2 en la migración inducida por VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL .....	61
VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen invasión a través de una vía dependiente de PI3K, activación de FAK y ERK1/2 .....	63

DISCUSIÓN .....	66
I. VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen un proceso de TEM .....	66
II. VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración e invasión a través de la vía PI3K/Akt .....	72
CONCLUSIONES.....	76
I. Participación de VEs IGF-1 en células MCF10A .....	76
II. Participación de VEs AL en las células MCF10A.....	76
REFERENCIAS.....	78



## ABREVIATURAS

AL: Ácido linoleico

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

EFA: Ácidos grasos esenciales

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGFRvIII: Variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico

ERK1/2: Cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2

FAK: Cinasa de adhesión focal

GH: Hormona de crecimiento

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

HRP: Peroxidasa de rábano picante

IGF-1: Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1

IGFBPs: Proteínas de unión a factores de crecimiento semejantes a insulina

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1

IR: Receptor de insulina

MAPKs: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MET: Microscopia electrónica de transmisión

MMPs: Metaloproteinasas

PIP2: Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato

PIP3: Fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato

PI3K: Fosfatidil inositol-3 cinasa

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PKB: Proteína cinasa B

PBS: Solución de buffer de fosfatos

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

RTKs: Receptores con actividad cinasa de tirosina

TEM: Transición epitelio-mesénquima

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$

VEs: Vesículas extracelulares

## RESUMEN

A nivel mundial el cáncer de mama es el cáncer más frecuente y es la principal causa de muerte en mujeres. El factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1) desempeña un papel importante en el desarrollo y función de la glándula mamaria; sin embargo, niveles elevados de IGF-1 están relacionados con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, debido a que estimula proliferación, sobrevivencia y transición epitelio-mesénquima (TEM) potenciando así la metástasis. Así mismo, una dieta alta en ácidos grasos, incrementa el riesgo de desarrollar esta neoplasia. El ácido linoleico (AL) es un ácido graso  $\omega$ -6 presente en las dietas y se ha relacionado con la progresión tumoral, induciendo proliferación, migración e invasión. Durante la progresión tumoral, la comunicación celular es de gran importancia y se ha demostrado que puede ser mediada por vesículas extracelulares (VEs). Estudios recientes indican que las VEs derivadas de células tumorales inducen proliferación, sobrevivencia, angiogénesis, evasión de la respuesta inmune y TEM. En este trabajo estudiamos si las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 o AL son capaces de inducir migración, invasión, TEM y la activación de Akt2 y ERK1/2 en células epiteliales mamarias no tumorigénicas MCF10A. Los resultados mostraron que las VEs generadas en células MDA-MB-231 después del estímulo con IGF-1 (VEs IGF-1) son capturadas por las células MCF10A, en las que disminuyen la expresión de E-cadherina e incrementan la expresión de vimentina, de N-cadherina y de los factores de transcripción Snail, Twist y SIP. Además, incrementan la secreción de la metaloproteinasa 9 (MMP-9) y la activación de Akt1/2 y ERK1/2. Así mismo, demostramos que las VEs IGF-1 promueven migración e invasión. En resumen, demostramos que las VEs IGF-1 inducen TEM en las células MCF10A. Por otro lado, demostramos que las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL (VEs AL) promueven la activación de Akt2, FAK y ERK1/2. Conjuntamente, inducen migración a través de una vía dependiente de PI3K/Akt y de ERK1/2, mientras que la invasión es dependiente de la actividad de PI3K.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent malignancy among females in developed countries and the leading form of cancer in women worldwide. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) plays an important role in the development and function of the mammary gland. However, high levels of IGF-1 have been associated with a higher risk of breast cancer. In addition, *in vitro* studies have shown that IGF-1 stimulates proliferation, survival and epithelial-mesenchymal transition (EMT). On the other hand, several studies suggest the association between a diet rich in fatty acids and risk of breast cancer. Linoleic acid (LA) is a  $\omega$ -6 essential polyunsaturated fatty acid that induces a variety of biological processes, including cell migration and invasion. Extracellular vesicles (EVs) are released into the extracellular space by different cell types, which mediate the intercellular communication and play an important role in different physiological and pathological processes such as cancer. In tumor progression, they promote proliferation, survival, angiogenesis, evading immune destruction and EMT. In this study, we determined whether EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with IGF-1 or LA are able to induce migration, invasion, EMT, and Akt2 and ERK1/2 activation in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A. Our findings showed that EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with IGF-1 (IGF-1 EVs) decrease the levels of E-cadherin, increase the expression of vimentin and N-cadherin and stimulate the secretion of metalloproteinase-9 in MCF10A cells. IGF-1 EVs also induce the expression of Snail1, Twist1 and Sip1, which are transcription factors involved in EMT. Moreover, IGF-1 EVs induce activation of ERK1/2 and Akt2, migration and invasion. In summary, we demonstrate that IGF-1 EVs induce an EMT process in MCF10A cells. With respect to EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated LA (LA EVs), we found that they induce activation of Akt2, FAK and ERK1/2 in MCF10A cells. In addition, LA EVs induce migration through a PI3K, Akt and ERK1/2-dependent pathway, while invasion is dependent on PI3K activity.

## **INTRODUCCIÓN**

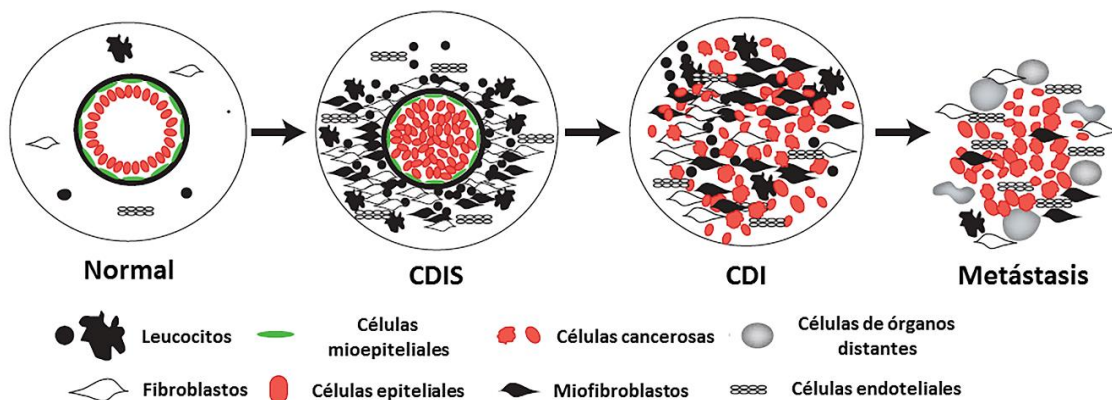
### **Glándula mamaria**

La glándula mamaria es el único órgano que completa su desarrollo en la edad adulta debido a la influencia cíclica de las hormonas reproductivas, por lo que este epitelio glandular altamente dinámico y especializado experimenta cambios morfogénéticos durante la pubertad, el embarazo, la lactancia y la involución, completando así algunos aspectos de la diferenciación de las células epiteliales mamarias. La glándula mamaria está compuesta de un sistema ramificado formado por ductos excretorios y alvéolos secretorios organizados en lóbulos. Estos últimos se encargan de la síntesis y secreción de leche durante la lactancia, mientras que los ductos transportan la leche desde los lóbulos hasta el pezón. El epitelio de los lóbulos y ductos consiste de dos capas de células epiteliales, la capa interna formada por células epiteliales lumbinales responsables de la síntesis y secreción de leche, mientras que la capa externa está formada por células mioepiteliales contráctiles que están en contacto con la membrana basal y participan en el proceso de eyección de leche (Ali and Coombes, 2002, Visvader, 2009, Polyak and Kalluri, 2010, Sopel, 2010). El mioepitelio mamario se encuentra rodeado por el microambiente de la mama, compuesto de matriz extracelular y varios tipos de células estromales como células endoteliales, fibroblastos, miofibroblastos, células del sistema inmune y adipocitos. El conjunto de múltiples tipos de células forma interacciones celulares entre sí y con el microambiente regulando el funcionamiento normal de la glándula mamaria y la tumorigénesis mamaria (Polyak and Kalluri, 2010, Place et al., 2011).

### **Cáncer de mama**

El desarrollo del cáncer de mama se caracteriza por la adquisición o pérdida de funciones celulares, resultando en una alteración en la organización del tejido. El tumor mamario puede originarse a partir de cualquier tipo de célula de la glándula

mamaria; sin embargo, los más comunes surgen en células epiteliales ductales y representan el 80 % de los casos, mientras que los tumores lobulares representan el 20% (Hansen and Bissell, 2000). La progresión del tumor mamario implica una serie de pasos secuenciales, iniciando con una hiperproliferación de células epiteliales lumbinales progresando a carcinoma *in situ*, en el que hay una disminución y alteración genotípica y fenotípica de las células mioepiteliales, debido a señales provenientes de células estromales y de células epiteliales tumorales. Asimismo, hay un incremento de células del estroma, las cuales, elevan la secreción de factores de crecimiento, citosinas, quimiocinas y metaloproteinasas (MMPs) para inducir la progresión tumoral. Este carcinoma puede evolucionar a carcinoma ductal invasivo, caracterizado por la degradación de la membrana basal y pérdida de células mioepiteliales, en consecuencia, las células tumorales pueden invadir el estroma y la vasculatura. Las células tumorales invaden el ambiente local debido a la pérdida de la estructura de los ductos y por el incremento en la producción de MMPs inducido por las células tumorales y estromales. A continuación, pueden atravesar la lámina basal, alcanzando el torrente sanguíneo y/o linfático e invadir órganos distantes, proceso conocido como metástasis (Fig.1), siendo ésta la principal causa de muerte. Los principales sitios de metástasis en cáncer de mama son el hueso, pulmón, hígado y cerebro (Hansen and Bissell, 2000, Polyak and Kalluri, 2010, Place et al., 2011).



**Figura 1. Progresión de un tumor mamario.** Representación esquemática de un ducto mamario normal, un carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma ductal invasivo (CDI) y un carcinoma de mama metastásico. Imagen modificada de Polyak y Kalluri, 2010.

## **Epidemiología**

Actualmente, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado a nivel mundial, con alrededor de 2.3 millones de casos nuevos registrados en 2020 (11.7 % del total). De la misma forma, representa la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de todo el mundo y en 2020 se registraron 685,000 muertes a causa de esta enfermedad (Sung et al., 2021). En las mujeres, el cáncer de mama representa uno de cada cuatro casos y una de cada seis muertes por cáncer, ocupando el primer lugar de incidencia en la mayoría de los países (159 de 185 países) y mortalidad en 110 países, por lo que representa un importante problema de salud pública. La tasa de incidencia es mayor en más de la mitad de países desarrollados incluyendo Australia, Europa y América del norte; mientras que, en países en vías de desarrollo como África y América central la incidencia es más baja. Sin embargo, la tasa de mortalidad es mayor en los países en desarrollo (Sung et al., 2021, Lima et al., 2021).

En México, el cáncer de mama ha sido la principal causa de mortalidad en las mujeres desde el año 2006, representando aproximadamente 14% de muertes relacionadas con cáncer. Además, esta neoplasia tiende a incrementar, especialmente en mujeres menores de 50 años (Knaul et al., 2009, Chavarri-Guerra et al., 2012). Durante las últimas décadas, las tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de mama han incrementado a nivel nacional. De acuerdo con datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en 2019, las entidades federativas con mayor número de casos fueron Morelos, Colima y Aguascalientes. Por otra parte, se registra que las entidades del norte y centro del país con las tasas más elevadas de mortalidad son Chihuahua, Ciudad de México y Baja California, mientras que los estados del sur presentan menores tasas de mortalidad, incluyendo Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Yucatán, Campeche, Guerrero y Tabasco. En 2019, la tasa de mortalidad por cáncer de mama a nivel nacional fue de 17.19 defunciones por cada 100 mil mujeres mayores de 20 años (INEGI 2020).

## **Factores de riesgo**

Estudios epidemiológicos han identificado distintos factores que favorecen el desarrollo del cáncer mamario. Estos factores de riesgo incluyen factores no modificables como los genéticos, factores reproductivos y hormonales, y factores modificables relacionados al estilo de vida (Barnard et al., 2015, Tao et al., 2015).

## **Factores genéticos**

Las mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2 y Her-2 son las de mayor riesgo. En particular, las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 son responsables de aproximadamente el 5-10% de los cánceres mamaros y representan un fenotipo más agresivo. Mientras que la sobreexpresión de Her-2, debido a una amplificación del gen, está presente en aproximadamente el 20% de los tumores mamaros primarios y se relaciona con un mal pronóstico (Sun et al., 2017).

## **Factores reproductivos y hormonales**

Numerosos estudios han establecido que la historia reproductiva de una mujer está asociada con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, es decir, una menarquia temprana está relacionada con una probabilidad del 5% de desarrollar un tumor primario y una menopausia tardía aumenta la probabilidad en un 50%. Asimismo, mujeres que tienen su primer hijo después de los 30 años incrementan el riesgo de desarrollar esta enfermedad en un 1.7%. Además, la nuliparidad está relacionada con el desarrollo del tumor mamario (Barnard et al., 2015, Tao et al., 2015).

Las hormonas esteroideas, estrógeno y progesterona, regulan el desarrollo de la glándula mamaria en la pubertad y durante el embarazo. Estas hormonas, están asociadas con la iniciación, desarrollo y progresión del cáncer de mama (Hansen and Bissell, 2000). Existe evidencia que asocia el incremento del riesgo de cáncer de mama con una exposición prolongada a estrógenos, esto incluye el riesgo

asociado con una menarquia temprana, embarazo y menopausia tardía. El uso de anticonceptivos orales y terapias de reemplazo de estrógenos también están implicados en el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Ali and Coombes, 2002).

### **Factores relacionados con el estilo de vida**

Los principales factores de riesgo relacionados con el estilo de vida incluyen consumo de alcohol, la dieta poco saludable, la inactividad física, la obesidad y el sobrepeso (Calle and Kaaks, 2004, Coughlin, 2019).

La dieta es un factor importante que contribuye al riesgo de desarrollar diferentes enfermedades incluyendo el cáncer de mama. El consumo excesivo de alcohol, carnes rojas, alimentos con alto índice glucémico y de grasas son algunos de los componentes dietéticos que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Existe evidencia que indica que la ingesta de ácidos grasos está asociada con el riesgo de desarrollar esta neoplasia. En particular, estudios analizaron la proporción del consumo de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 sugiriendo que una proporción más alta de grasas  $\omega$ -6 incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Simopoulos, 2008, Coughlin, 2019).

### **Ácido linoleico (AL) y cáncer de mama**

Los ácidos grasos libres son una importante fuente de energía y también actúan como moléculas de señalización. En las células epiteliales de la glándula mamaria los ácidos grasos libres se utilizan como fuente de energía y para la síntesis de lípidos de la leche, en cambio en las células cancerosas mamarias pueden mediar diversos procesos celulares incluyendo proliferación, migración e invasión, a través de la activación de sus receptores (Yonezawa et al., 2004, Soto-Guzman et al., 2008). Dentro de estos ácidos grasos, se encuentran los ácidos grasos esenciales (EFAs, por sus siglas en inglés), que son necesarios para la vida, pero no pueden ser sintetizados en el organismo, razón por la cual tienen que ser obtenidos a través de la dieta. Existen dos clases de EFAs: los de la serie  $\omega$ -3 y



los de la serie  $\omega$ -6. Los ácidos grasos  $\omega$ -6 están representados por el AL, un ácido graso poliinsaturado esencial (PUFA, por sus siglas en inglés), siendo el más abundante en las dietas. El AL puede ser un precursor de los eicosanoides debido a que puede ser metabolizado a ácido araquidónico (AA), posteriormente el AA puede convertirse en una variedad de eicosanoides. Por lo tanto, el AL es capaz de inducir respuestas inflamatorias inapropiadas contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades crónicas (Fritsche, 2008, Simopoulos, 2008, Simopoulos, 2016). Particularmente, se demostró que el AL induce proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama y un proceso de transición epitelio mesénquima en células epiteliales mamarias no tumorigénicas MCF10A (Yonezawa et al., 2004, Byon et al., 2009, Serna-Marquez et al., 2017, Espinosa-Neira et al., 2011).

Por otro lado, estudios realizados en humanos y roedores demuestran que dietas altas en grasas, enriquecidas en ácidos grasos  $\omega$ -6, aumentan el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes y resistencia a leptina. Asimismo, estudios prospectivos demostraron que un aumento o desbalance en la proporción de ácidos grasos  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, favorecido con un incremento en el consumo de  $\omega$ -6 aumenta el riesgo de obesidad (Simopoulos, 2016).

### **Obesidad y sobrepeso**

La obesidad se encuentra asociada a enfermedades como el cáncer, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, esta relación se ha convertido en una importante preocupación para la salud pública (Cohen and LeRoith, 2012). Particularmente, la obesidad representa un factor de riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, esta asociación, en parte, es debido a las alteraciones en los niveles de estrógenos y a la hiperinsulinemia, ya que la grasa corporal proporciona un sustrato para la producción de estrógeno a partir de andrógenos en el tejido adiposo, mientras que los niveles más elevados de insulina pueden contribuir al desarrollo, crecimiento y progresión tumoral. La obesidad y la diabetes con frecuencia ocurren al mismo tiempo en el mismo individuo por lo que se

asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama después de la menopausia (Coughlin and Smith, 2015, Kang et al., 2018, Coughlin, 2019). Además, la obesidad está asociada con el incremento en la concentración del factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) circulante. Por lo que, la asociación que existe entre la obesidad, diabetes y cáncer al parecer está relacionada con la resistencia a insulina, hiperinsulinemia y niveles incrementados de IGF-1 (Cohen and LeRoith, 2012, Lewitt et al., 2014).

### **Generalidades del IGF-1**

Los factores relacionados al estilo de vida como la dieta, la nutrición y la inactividad física, están asociados con el riesgo de desarrollar cáncer de mama. La nutrición, el balance de energía, la composición de macronutrientes de la dieta y los niveles de actividad física son los principales determinantes de la bioactividad de IGF-1. Este factor de crecimiento es regulado metabólicamente y media los efectos de la nutrición en el crecimiento celular, por ello, se ha relacionado con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer, lo cual, puede estar mediado por alteraciones en su sistema (Pollak et al., 2004, Coughlin and Smith, 2015, Zielinska et al., 2015). Estudios previos demostraron que la liberación de IGF-1 derivado de adipocitos precursores y diferenciados de pacientes con obesidad es mayor en comparación con individuos delgados. De manera que esto concuerda con los niveles más elevados de IGF-1 circulante que se encuentran frecuentemente en la obesidad y apoya la noción de que la obesidad podría contribuir a la progresión del cáncer de mama. Además de la obesidad, la hiperinsulinemia influye en la cantidad de IGF-1 libre disponible para las células y los resultados de los estudios epidemiológicos indican que los niveles más altos de IGF-1 circulantes están asociados con un mayor riesgo de cáncer de mama (D'Esposito et al., 2012, Coughlin and Smith, 2015, Kang et al., 2018).

## **Sistema de IGFs**

Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) tienen un papel importante en la función y desarrollo de muchos tejidos, incluyendo a la glándula mamaria. Asimismo, actúan como reguladores endocrinos, paracrinos y autocrinos de varios procesos biológicos normales y neoplásicos (Gross and Yee, 2003, Wood and Yee, 2000, Christopoulos et al., 2015, Motallebnezhad et al., 2016).

El sistema de IGFs está compuesto de diferentes moléculas clave: 1) Los ligandos IGF tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2), los cuales son estructuralmente similares entre sí y con insulina; 2) Los receptores de IGF-1 e IGF-2 (IGF-1R e IGF-2R, respectivamente) así como del receptor de insulina (IR) y 3) La familia de proteínas de unión con alta afinidad a IGFs (IGFBPs) (Pollak et al., 2004, Gross and Yee, 2003, Motallebnezhad et al., 2016, Li et al., 2017).

IGF-1 es sintetizado en el hígado y secretado al torrente sanguíneo bajo el control de la hormona de crecimiento (GH). No obstante, IGF-1 también puede ser producido localmente en otros tejidos por medio de mecanismos autocrinos y paracrinos. La mayor parte del IGF-1 en la circulación es producido por el hígado y está conjugado con las IGFBPs, esto le permite a la GH producir IGF-1 de manera continua. Asimismo, IGF-2 se expresa en hígado y en sitios extra hepáticos, no obstante, su expresión es independiente de la GH (Pollak et al., 2004, Christopoulos et al., 2015, Motallebnezhad et al., 2016).

Las IGFBPs también son producidas en el hígado y se encuentran presentes en la circulación y en fluidos extravasculares. Actualmente, existen seis miembros de esta familia, denominados IGFBP1 a IGFBP6, las cuales ayudan a prolongar la vida media de los IGFs circulantes debido a su alta afinidad por estos ligandos, haciendo que su biodisponibilidad esté influenciada por la concentración de IGFBPs. En la circulación, aproximadamente más del 90% de IGF-1 se encuentra unido a cada una de las 6 IGFBPs, principalmente a IGFBP-3. Además de regular la vida media y biodisponibilidad de los IGFs, las IGFBPs también modulan el transporte de los IGFs a través de las membranas capilares, localizan los IGFs en tejidos específicos y participan en la unión de los IGFs a sus receptores (Wood

and Yee, 2000, Seccareccia and Brodt, 2012, Bach, 2015, Christopoulos et al., 2015, Li et al., 2017).

### **Receptores y transducción de señal mediadas por IGFs**

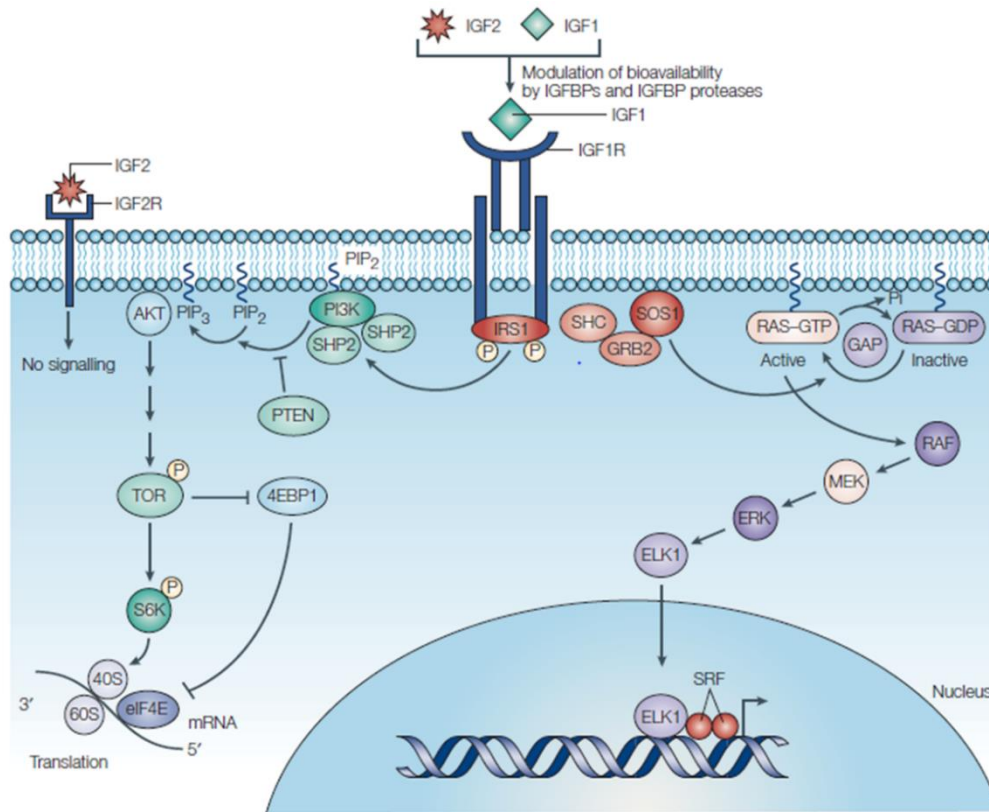
Los dos principales receptores de los ligandos IGFs son IGF-1R e IGF-2R, difieren completamente en estructura y función. IGF-1R es un receptor transmembranal con actividad tirosina cinasa y estructuralmente comparte 70% de homología con IR. Este receptor es expresado en una gran mayoría de tipos celulares, excepto en hepatocitos y linfocitos-T, desempeñando un papel importante en la regulación de diversos procesos celulares como: proliferación, diferenciación, desarrollo, sobrevivencia, crecimiento, resistencia a apoptosis y metabolismo. El IGF-1R es un receptor heterotetramérico, formado por dos subunidades  $\beta$  idénticas transmembranales y dos subunidades  $\alpha$  idénticas extracelulares que se encuentran unidas por enlaces disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  actúan como dominio de unión al ligando, mientras que las subunidades  $\beta$  tienen actividad de tirosina cinasa (Gross and Yee, 2003, Seccareccia and Brodt, 2012, Singh et al., 2014, Motallebnezhad et al., 2016).

Por otro lado, el receptor IGF-2R, a diferencia de IGF-1R, no posee capacidad de señalización intracelular debido a que carece de un dominio intrínseco de tirosina cinasa. Este receptor es monomérico y también es conocido como receptor manosa-6 fosfato (M6P) independiente de catión, juega un papel importante en la limpieza y degradación de IGF-2 en los lisosomas. Asimismo, diversos estudios sugieren que participa como un supresor de tumores (Wood and Yee, 2000, Pollak et al., 2004, Zielinska et al., 2015).

El IGF-1R puede formar receptores híbridos con el IR (IGF-1R/IR) debido a que están estrechamente relacionados en secuencia primaria y estructura general, por lo tanto, IGF-1 e insulina son capaces de unirse y activar el receptor de cada uno, así como a IGF-1R/IR. Sin embargo, IGF-1 es considerado el principal ligando del receptor híbrido ya que tiene mayor afinidad por éste. El receptor híbrido está compuesto de un heterodímero  $\alpha$ - $\beta$  de IGF-IR y un heterodímero  $\alpha$ - $\beta$  de IR y sus

niveles de expresión son diferentes en los tejidos (Singh et al., 2014, Zielinska et al., 2015, Bach, 2015).

La activación del IGF-1R depende de la unión del ligando, IGF-1 se une a las subunidades  $\alpha$ , lo que estimula la actividad intrínseca de cinasa de las subunidades  $\beta$  del receptor, conduciendo a una autofosforilación de varios residuos de tirosina específicos. A su vez, esos residuos fosforilados proveen sitios de unión para diferentes sustratos, incluyendo a los sustratos del receptor de insulina (IRS-1,-2 y -4) y Shc, involucrados en la propagación de la señal. No obstante, IRS-1 y -2 son considerados los principales sustratos del IGF-1R y contienen múltiples sitios de fosforilación en residuos de tirosinas que funcionan como anclaje para varias moléculas de señalización río abajo, por lo tanto, son capaces de amplificar la señal e inducir diferentes respuestas celulares. El IGF-1R activado promueve la fosforilación de IRS-1, induciendo la activación de dos principales vías río abajo del receptor, por un lado puede activar la vía fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K)/Akt y por otro es capaz de reclutar a la proteína adaptadora Grb2 llevando a la activación de la vía MAPK/ERK (Fig. 2). Por otro lado, la unión de IGF-2 a su receptor resulta en la internalización y degradación del receptor. Sin embargo, puede señalizar a través de IGF-1R, IR e IGF-1R/IR (Seccareccia and Brodt, 2012, Zielinska et al., 2015, Li et al., 2017).



**Figura 2. Activación del IGF-1R y transducción de señal por unión de IGF-1.** Después de la unión del ligando, se activa la actividad tirosina cinasa del receptor promoviendo la activación de señales río abajo, incluyendo la vía PI3K/Akt y la cascada de las MAPKs, las cuales regulan la activación o inhibición de múltiples blancos resultando en diversos efectos a nivel celular. La señalización de la vía PI3K/Akt promueve efectos como regulación de procesos metabólicos, activación de proteínas antiapoptóticas y síntesis de proteínas. La vía de las MAPK es responsable principalmente del crecimiento y proliferación celular. La biodisponibilidad de los ligandos es regulada por IGFBPs. IGF-2R carece de actividad tirosina-cinasa. Imagen de Pollak et al., 2004.

### Participación de IGF-1 e IGF-1R en el desarrollo de la glándula mamaria y en cáncer

El desarrollo normal de la glándula mamaria es regulado y controlado por la expresión coordinada de hormonas y factores de crecimiento. Algunas de las familias de factores de crecimiento que desempeñan papeles importantes en el desarrollo y función de la glándula mamaria, incluyen, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento

transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IGF-1 (Kleinberg et al., 2009, Hynes and Watson, 2010). Diferentes estudios demuestran que IGF-1 desempeña un papel importante en el desarrollo, diferenciación y crecimiento de la glándula mamaria. La GH puede estimular la producción de IGF-1 en la glándula mamaria, el cual a su vez induce el desarrollo de los brotes terminales, primeras estructuras que se forman y dirigen el desarrollo de la glándula mamaria durante la pubertad. El IGF-1 junto con otros factores de crecimiento y hormonas es requerido para el desarrollo alveolar-lobular. Además, IGF-1 puede participar en los cambios estructurales que ocurren en la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia (Kleinberg et al., 2000, Kleinberg et al., 2009, Gross and Yee, 2003).

A pesar de que IGF-1 es un regulador clave del crecimiento y supervivencia de células epiteliales mamarias, diversos estudios han demostrado que alteraciones en el sistema de IGFs incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Algunas de esas alteraciones incluyen un incremento en los niveles de IGF-1 en suero, sobreexpresión de IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IRS-1 y disminución en los niveles circulantes de IGFbps (Farabaugh et al., 2015, Zielinska et al., 2015, Motalebnezhad et al., 2016). Particularmente, el análisis de los niveles de ARNm de 962 muestras de cáncer de mama demostró que el 45.3% de las muestras presenta alteraciones moleculares en al menos un miembro de la familia de IGFs. Además, en el 9% de los tumores, IGF-1R está sobreexpresado, mutado o amplificado (Farabaugh et al., 2015). De la misma forma, la expresión incrementada de éste receptor ha sido reportada en muchos tipos de líneas celulares y en biopsias tumorales; así mismo, se ha relacionado con fenotipos tumorales más agresivos y con una baja tasa de supervivencia en cáncer de mama triple negativo (TNBC), caracterizado por la carencia de la expresión del receptor a progesterona y estrógenos, así como por la ausencia de la sobreexpresión de Her-2 (Kleinberg et al., 2009, Christopoulos et al., 2015).

El sistema IGF-1 desempeña un papel importante en el desarrollo y crecimiento del tumor a través de interacciones endocrinas, paracrinas y autocrinas entre las células estromales y cancerosas dentro del microambiente tumoral. El IGF-1R participa en la transformación maligna y en el mantenimiento del fenotipo

transformado debido a su capacidad de mantener proliferación, sobrevivencia celular, evasión de apoptosis, migración e invasión, angiogénesis, metástasis y transición epitelio-mesénquima (TEM) a través de la activación de diversas vías de señalización río abajo, tales como PI3K/Akt y Ras/Raf/ERK (Kleinberg et al., 2009, Seccareccia and Brodt, 2012, Christopoulos et al., 2015, Zielinska et al., 2015, Motallebnezhad et al., 2016, Li et al., 2017).

### **PI3K/Akt**

Diversos estudios han demostrado que la vía PI3K/Akt está involucrada en diversos procesos celulares como el crecimiento, la sobrevivencia, la proliferación, la diferenciación, la migración y el metabolismo de glucosa, los cuales, frecuentemente se encuentran desregulados en muchos tipos de cáncer (Fresno Vara et al., 2004, Noorolyai et al., 2019, Chin and Toker, 2009).

La familia de las cinasas de lípidos PI3Ks se caracterizan por su capacidad de fosforilar, el grupo OH en la posición 3 de los fosfolípidos de inositol. Ésta familia se clasifica de acuerdo a su homología de secuencia, especificidad de sustrato y distribución de tejidos. Los miembros de la clase I son heterodímeros compuestos de una subunidad catalítica (por ejemplo, p110) y una subunidad regulatoria/adaptadora (por ejemplo, p85); ésta clase se divide en subclase IA (PI3K $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta$ ), la cual, es activada por receptores con actividad tirosina cinasa (RTKs), y subclase IB (PI3K $\gamma$ ), activada por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Fresno Vara et al., 2004, Noorolyai et al., 2019, Porta et al., 2014).

Existen tres isoformas de Akt; Akt1, Akt2 y Akt3, las cuales comparten una alta homología estructural y secuencia, pero presentan funciones específicas y no redundantes. Akt1 y Akt2 se expresan ubicuamente, mientras que Akt3 tiene una distribución restringida en el tejido neuronal (Irie et al., 2005, Chin and Toker, 2009, Fayard et al., 2010). Cada isoforma está compuesta de 3 dominios conservados: un dominio de homología con plestrina (PH) en la región N-terminal, un dominio de cinasa central, en el cual se encuentra un residuo de Treonina-308 (Thr-308) y un dominio hidrofóbico (HD) en la región C-terminal, que



contiene un residuo de Serina-473 (Ser-473) en Akt1. La fosforilación en ambos residuos se requiere para la máxima activación de Akt (Fresno Vara et al., 2004, Liu et al., 2009, Fayard et al., 2010, Porta et al., 2014).

La vía PI3K/Akt puede ser activada por RTKs o por GPCRs. En el caso de los RTKs, la activación del receptor resulta en la asociación de la subunidad reguladora de PI3K a través de su dominio SH2 con el receptor, esto conduce a la activación alostérica de la subunidad catalítica de PI3K. Una vez activa PI3K, puede fosforilar a su sustrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) y generar el segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), este último recluta a la membrana plasmática proteínas como Akt y PDK1 a través de su dominio PH. Entonces, Akt se une a PIP3 a través de dicho dominio, lo que origina un cambio conformacional en Akt resultando en la exposición de sus sitios de fosforilación, pudiendo ser activada por PDK1, PDK2 o mTOR. Finalmente, Akt en su forma activa puede fosforilar a diversos blancos para promover distintos procesos celulares incluyendo la proliferación, la sobrevivencia, la migración y la TEM (Fig. 2) (Chin and Toker, 2009, Liu et al., 2009, Fayard et al., 2010, Xue and Hemmings, 2013, Porta et al., 2014, Noorolyai et al., 2019).

## **MAPK/ERK1/2**

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son cinasas Ser-Thr que median respuestas de diferentes señales extracelulares, incluidas las de los factores de crecimiento, hormonas, citosinas y estrés; regulando numerosos procesos como, adhesión celular, proliferación, sobrevivencia, metabolismo, repuesta al estrés, apoptosis, diferenciación y migración. Sin embargo, cuando están desreguladas contribuyen en el desarrollo de diferentes patologías incluyendo el cáncer (Kim and Choi, 2010, Plotnikov et al., 2011, Roskoski, 2012, Yang et al., 2013). La cascada MAPK consiste de tres cinasas (MAP3K, MAPKK y MAPK), la señal se propaga por medio de fosforilación secuencial y activación de cinasas secuenciales, conduciendo a la fosforilación de proteínas regulatorias. Las MAPK catalizan la fosforilación y modulan la actividad de diversos sustratos, como

factores de transcripción, supresores transcripcionales y proteínas remodeladoras de la cromatina. Particularmente, la localización de esos sustratos es nuclear y regulan cambios en la expresión de genes; sin embargo, también fosforilan sustratos que se encuentran en el citoplasma, en la mitocondria, en el Golgi y en el retículo endoplásmico (Zhang and Liu, 2002, Kim and Choi, 2010, Plotnikov et al., 2011, Roskoski, 2012, Yang et al., 2013).

En mamíferos, existen cuatro principales familias de MAPK: las cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), p38 y ERK5. Generalmente, la vía ERK1/2 responde a factores de crecimiento, mientras que las vías JNK y p38 responden a una variedad de señales de estrés celular o a citosinas proinflamatorias (Kim and Choi, 2010, Plotnikov et al., 2011, Yang et al., 2013).

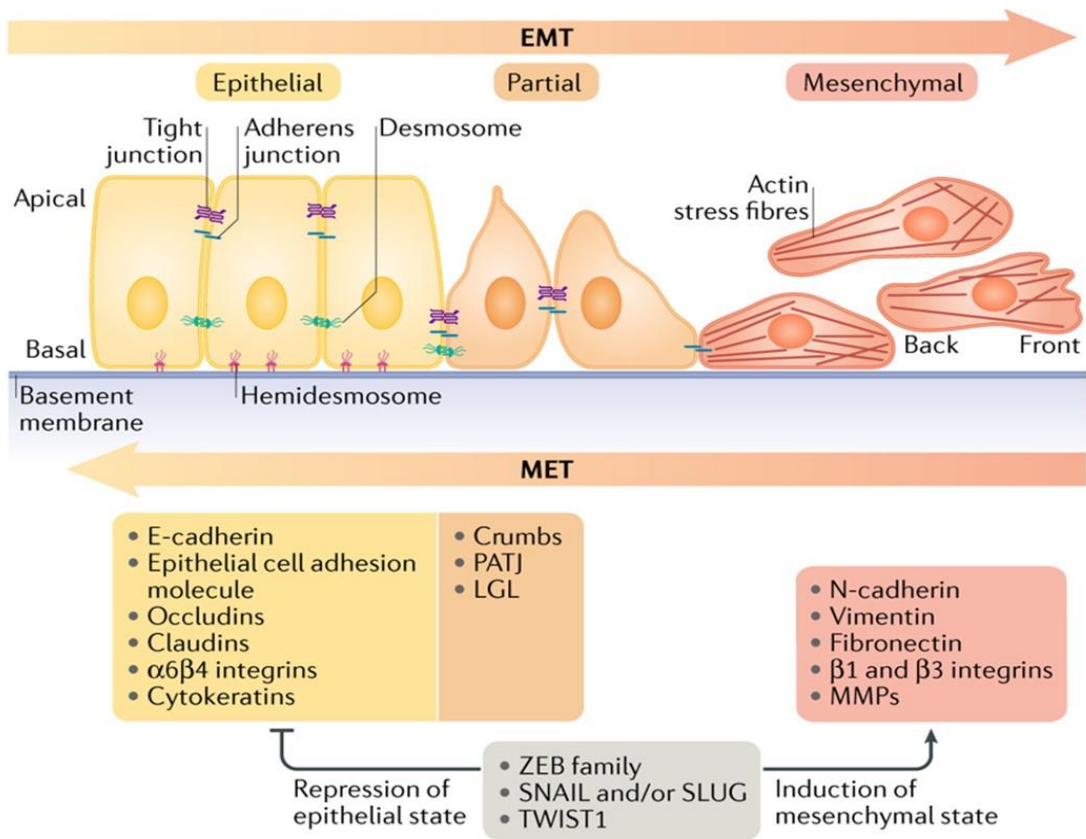
La cascada ERK1/2 fue la primera vía de las MAPK elucidada y es la mejor caracterizada. Las proteínas ERK1/2 son idénticas y presentan aproximadamente un 84% de homología en su secuencia, contienen extremos N- y C-terminal que proveen especificidad de señalización, además contienen una inserción de 31 aminoácidos en el dominio de cinasa que proporciona especificidad funcional (Ramos, 2008, Roskoski, 2012). La familia ERK1/2 participa en la cascada de señalización Ras-Raf-MEK-ERK, la cual es activada por diversos mecanismos, tal como la activación por RTKs e integrinas. De manera general, la unión del ligando a un RTK promueve su dimerización y autofosforilación, conduciendo al reclutamiento de la proteína adaptadora Grb-2 y a la cual se une Sos, una proteína de intercambio de nucleótidos de guanina, que promueve la activación de la GTPasa pequeña Ras en la membrana plasmática, a su vez, Ras recluta e induce la activación de la familia de cinasas Raf (también conocida como MAP3K). Una vez activa Raf, promueve la activación de la segunda cinasa de la cascada MEK1/2 (MAPKK), por medio de la fosforilación de dos residuos de Ser. Posteriormente, MEK1/2 cataliza la fosforilación de ERK1/2 (MAPK) en tirosina (Tyr) 204 y posteriormente en Thr 202, siendo ambas fosforilaciones requeridas para su activación, una vez activo puede translocarse al núcleo y fosforilar diferentes factores de transcripción (Fig. 2), tales como Elk-1, c-Fos, Ets-1, c-Myc,

c-Jun, ATF-2, entre otros. Asimismo, en el citoplasma puede fosforilar algunas cinasas y proteínas del citoesqueleto (Zhang and Liu, 2002, Ramos, 2008, Kim and Choi, 2010, Plotnikov et al., 2011, Roskoski, 2012).

## **TEM**

Diversos estudios han demostrado que las vías PI3K/Akt y Ras/Raf/MEK/ERK son las principales cascadas río abajo de IGF-1R y ambas vías están involucradas en la regulación del proceso de TEM (Xu et al., 2015, Li et al., 2017). La TEM desempeña un papel crucial tanto en procesos fisiológicos como la embriogénesis de organismos multicelulares, regeneración de tejidos y reparación de heridas; así como en procesos patológicos como fibrosis y cáncer. La TEM se caracteriza por ser un proceso biológico de múltiples etapas, que incluye la ruptura de contactos célula-célula, pérdida de polaridad celular, remodelación de adhesiones célula-matriz y adquisición de propiedades mesenquimales (Thiery et al., 2009, Lamouille et al., 2014, Xu et al., 2015, Dongre and Weinberg, 2019).

La transición de células epiteliales a mesenquimales requiere (1) pérdida de la polaridad: cambiando su morfología celular; (2) cambios en la expresión de proteínas: disminución de marcadores epiteliales como E-cadherina,  $\beta$ -catenina, desmoplaquina y citoqueratina (-8 y -18), e incremento en la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina, vimentina, fibronectina, SMA y MMPs; así como (3) cambios en el comportamiento biológico, adquiriendo propiedades migratorias e invasivas. Todos estos cambios morfogenéticos son regulados por diversos factores de transcripción, como Slug, Fox2, Snail1/2, ZEB1/2 y Twist (Fig. 3). Los factores de transcripción Snail y ZEB pueden unirse a las cajas E del promotor de E-cadherina reprimiendo directamente su transcripción, mientras que Twist y Fox lo hacen de manera indirecta (Gavert and Ben-Ze'ev, 2008, Thiery et al., 2009, Lamouille et al., 2014, Dongre and Weinberg, 2019, Lu and Kang, 2019).



**Figura 3. Esquema del proceso TEM.** Las células epiteliales tienen una polaridad apical-basal, se mantienen unidas a través interacciones celulares y expresan marcadores epiteliales, durante el proceso de TEM pierden sus características epiteliales adquiriendo un fenotipo mesenquimal como capacidades migratorias e invasivas. Imagen de Dongre y Weinberg 2018.

El principal inductor del proceso de TEM es el TGF $\beta$ , no obstante, otros inductores son el EGF, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de hepatocitos y también puede ser desencadenado mediante la señalización de múltiples RTKs, NF- $\kappa$ B, así como de las vías Wnt/ $\beta$ -catenina, Notch y Hedgehog, los cuales llevan a la activación de los factores de transcripción que inducen TEM (Lamouille et al., 2014, Burger et al., 2017, Dongre and Weinberg, 2019).

El proceso de TEM puede ser empleado por las células cancerosas para inducir la progresión tumoral, permitiendo su separación del tumor primario debido a que adquieren la capacidad de migrar, secretar MMPs (permitiendo la degradación de la membrana basal) e invadir tejido circundante. Numerosos estudios han

demostrado una correlación entre éste proceso y un comportamiento invasivo y metastásico en células cancerosas (Lu and Kang, 2019).

### **Vesículas extracelulares**

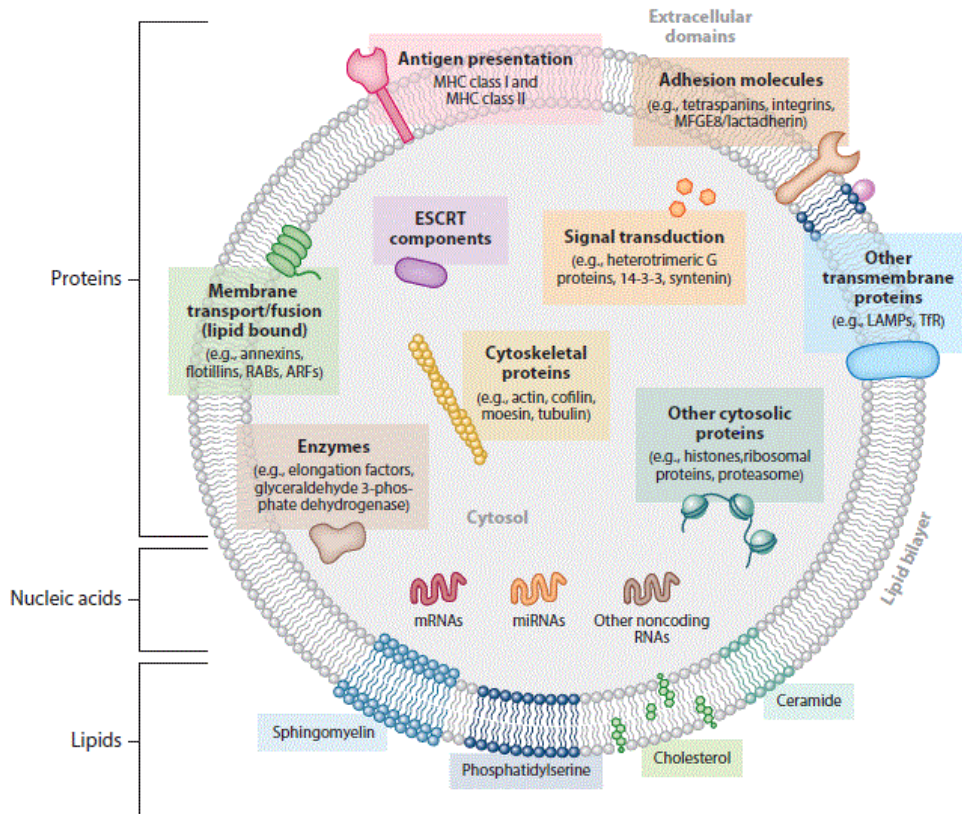
La comunicación celular es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo y es mediada por la interacción célula-célula o a través de la secreción de moléculas solubles. Interesantemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de comunicación celular mediado por fragmentos esféricos de membrana denominados vesículas extracelulares (VEs), que son secretadas por diferentes tipos de células y operan a distancias cortas y largas (Camussi et al., 2010, Raposo and Stoorvogel, 2013, Turturici et al., 2014, Vader et al., 2014, Greening et al., 2015, Kalra et al., 2016). Con respecto a los mecanismos por los cuales las VEs median la comunicación celular, se han propuesto tres vías: (1) a través de la interacción directa ligando-receptor entre las VEs y su célula blanco, (2) fusión de las VEs con la célula blanco, resultando en la transferencia de su contenido y (3) endocitosis de las VEs por su célula blanco, liberando así su contenido (Mathivanan et al., 2010, Turturici et al., 2014, Vader et al., 2014).

La liberación de las VEs tanto por células eucariotas y procariotas, indica que es un proceso de comunicación celular que ha sido conservado a lo largo de la evolución (Raposo and Stoorvogel, 2013). Sin embargo, el mayor interés actual es debido a su presencia en diversos fluidos biológicos humanos como sangre, orina, saliva, leche materna, semen, fluido amniótico, fluidos ascíticos, fluido cerebro espinal y bilis (van der Mijl et al., 2014, Vader et al., 2014, Kalra et al., 2016).

De acuerdo a su biogénesis y tamaño las VEs se clasifican en cuerpos apoptóticos, exosomas y microvesículas (Raposo and Stoorvogel, 2013, Colombo et al., 2014, Turturici et al., 2014). Los exosomas miden aproximadamente de 30 a 100 nm de diámetro, tienen un origen endocítico. Su biogénesis comienza en los cuerpos multivesiculares, a partir de invaginaciones se forman y acumulan vesículas intraluminales. Posteriormente, estos cuerpos multivesiculares pueden seguir dos vías, una es traficar hacia los lisosomas donde son degradados y la

otra vía es fusionarse con la membrana plasmática liberando su contenido (vesículas intraluminales) al espacio extracelular, denominándose exosomas (Camussi et al., 2010, Mathivanan et al., 2010, Raposo and Stoorvogel, 2013, Ciardiello et al., 2016, Kalra et al., 2016). A diferencia de los exosomas, las microvesículas miden aproximadamente de 100 a 1000 nm de diámetro y se generan directamente de la membrana plasmática a través de protrusiones y por medio de fisión se liberan al espacio extracelular. La regulación de este proceso involucra un incremento en los niveles intracelulares de calcio, varias enzimas y proteínas como calpaina, flipasa, flopasa, escramblasa y gelsolina (Mathivanan et al., 2010, Kalra et al., 2016). Concretamente, los niveles intracelulares de calcio modifican asimétricamente la distribución de fosfolípidos de la membrana plasmática, debido a la inhibición de translocasa y activación de escramblasa, la cual, transloca fosfatidilserina de la monocapa interna a la monocapa externa de la membrana plasmática. Además, el calcio también contribuye a la reorganización del citoesqueleto a través de la activación de calpaina y gelsolina, permitiendo la formación de protrusiones en la membrana (Camussi et al., 2010, Turturici et al., 2014).

La composición proteica y función de las VEs varía dependiendo del origen del tipo celular. Diversos estudios han reportado algunas de las moléculas que pueden llevar en su interior, incluyendo moléculas que participan en la transducción de señales, enzimas y algunos tipos de RNAs; mientras que, en su exterior presentan una variedad de fosfolípidos, moléculas de adhesión, moléculas presentadoras de antígeno, proteínas componentes de las balsas lipídicas, así como otras proteínas transmembranales (Fig. 4) (Mathivanan et al., 2010, Raposo and Stoorvogel, 2013, Colombo et al., 2014, Kalra et al., 2016).



**Figura 4. Composición molecular de las vesículas extracelulares.** Imagen de Colombo et al 2014.

## VEs y cáncer

Las VEs participan en distintos procesos fisiológicos como en la respuesta inmune, en el mantenimiento de células troncales, en la inflamación, la coagulación, así como en procesos patológicos como el cáncer (Camussi et al., 2010, Raposo and Stoorvogel, 2013, Turturici et al., 2014). Algunos estudios han reportado que el número de VEs es mayor en pacientes con cáncer en comparación con individuos sanos y está correlacionado con un mal pronóstico (Baran et al., 2010, Camussi et al., 2010, Vader et al., 2014). Además, se han descrito niveles aberrantes de VEs en otras enfermedades como Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, preeclampsia, diabetes, síndrome coronario agudo, hipertensión severa, esclerosis múltiple, vasculitis, así como en pacientes

con falla renal crónica (Camussi et al., 2010, Vader et al., 2014). El número, origen celular y composición depende del estado de la enfermedad (Turturici et al., 2014).

Importantemente, diversos estudios han reportado que las VEs participan en el establecimiento y en el mantenimiento de cada una de las características del cáncer descritas por Hanahan y Weinberg (Kanada et al., 2016), de acuerdo a como se describe a continuación:

- Mantenimiento de la señal proliferativa. Las VEs secretadas por células cancerosas transfieren oncogenes a otras células (Camussi et al., 2010, Kanada et al., 2016). Por ejemplo, células agresivas de glioma que expresan una forma truncada del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR variante III), conocido como EGFRvIII, liberan VEs que contienen dicho factor, el cual, es capturado por células de glioma que no lo expresan promoviendo así su transformación maligna (Al-Nedawi et al., 2008).
- Supervivencia celular. Se ha reportado que VEs derivadas de células cancerosas transfieren un fenotipo anti-apoptótico a las células vecinas, como crecimiento independiente de anclaje y capacidad de sobrevivir en condiciones limitantes de nutrientes (Kanada et al., 2016). Además, contribuyen a la supervivencia celular, previniendo la acumulación intracelular de fármacos quimioterapéuticos, haciendo resistentes a las células a la quimioterapia (Camussi et al., 2010, Turturici et al., 2014).
- Evasión de la respuesta inmune. Esto ocurre a través de un mecanismo denominado resistencia al complemento (Camussi et al., 2010); en donde las células cancerosas secretan VEs que contienen moléculas inhibitoras del complemento (CD46) para inhibir a proteínas del complemento (C4b y C3b) (Hakulinen et al., 2004). Asimismo, liberan VEs que contienen el ligando Fas que induce apoptosis de células T (Turturici et al., 2014).
- Angiogénesis. Las VEs derivadas de tumores contienen RNA mensajero que codifica para factores de crecimiento, tal como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), los cuales son transferidos a las células endoteliales. De la misma manera, estimulan la secreción de factores



proangiogenicos de células estromales y facilitan la proliferación de células endoteliales (Turturici et al., 2014, Vader et al., 2014).

- Invasión y metástasis. Las células tumorales secretan VEs que pueden contener o exponer MMPs, así como sus zimógenos y activadores de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) para degradar matriz extracelular e invadir (Ciardiello et al., 2016). Así mismo, VEs derivadas de diferentes tipos de tumores, expresan distintos patrones de integrinas y éstas pueden determinar metástasis específica en los órganos (Kanada et al., 2016).

Recientemente, diversos estudios reportaron que el número de VEs en pacientes con cáncer de mama se encuentra elevado, en comparación con pacientes sanos (Ramirez-Ricardo et al., 2020, Galindo-Hernandez et al., 2015). Asimismo, las VEs derivadas de pacientes con cáncer de mama y de líneas celulares de cáncer de mama estimuladas con AL promueven un proceso semejante al de TEM, migración e invasión en células epiteliales mamarias no tumorales (Galindo-Hernandez et al., 2014, Galindo-Hernandez et al., 2015). Por otro lado, un estudio reciente demostró el papel de la insulina sobre la secreción de VEs derivadas de células de cáncer colorrectal (CRC), en el cual insulina incrementó el número de VEs secretadas por células CRC y modificó el cargo proteómico de las VEs, por medio de la activación de la vía PI3K/Akt. Asimismo, esas VEs tienen el potencial de estimular proliferación en células receptoras (Liem et al., 2017).

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente y es la principal causa de muerte en mujeres de todo el mundo, su incidencia incrementa cada año por lo que se considera un problema de salud pública. Específicamente, el TNBC se caracteriza por una alta malignidad, recurrencia, metástasis, mal pronóstico y opciones de tratamiento limitadas. Estudios epidemiológicos refieren una correlación positiva entre la obesidad, la diabetes y el riesgo de desarrollar cáncer. La conexión entre estas enfermedades podría ser explicada por la hiperinsulinemia, los niveles incrementados de IGF-1, los niveles de hormonas esteroideas, moléculas proinflamatorias y ácidos grasos. Por ende, son necesarios estudios experimentales para dilucidar los mecanismos celulares y moleculares que orquestan estas moléculas, particularmente en cáncer. Concretamente, el IGF-1 participa en el desarrollo y función de la glándula mamaria, sin embargo, se ha relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, debido a que en modelos *in vitro* se ha visto que estimula la proliferación, la sobrevivencia y la migración celular. Además, la sobreexpresión de IGF-1 e IGF-1R se ha asociado con una mayor incidencia de metástasis y una disminución de sobrevivencia en pacientes con TNBC. Con el mismo interés, el AL ha sido objeto de estudio, ya que es el ácido graso más abundante en la dieta occidental y se ha relacionado con la progresión tumoral del cáncer de mama, promoviendo procesos como la proliferación, la migración y la invasión celular. La comunicación intercelular mediada por VEs ha despertado especial interés debido a que son liberadas por células sanas y por células cancerosas. Su liberación ocurre bajo distintos contextos bioquímicos, incluyendo el estímulo por ligandos solubles. Por lo tanto, es de gran interés evaluar la participación del IGF-1 y del AL en la secreción de VEs derivadas de células TNBC y si estas VEs son capaces de inducir la TEM, una etapa fundamental en la metástasis del cáncer de mama. Así como dilucidar los mecanismos de señalización que regulan este proceso.

## **HIPÓTESIS**

Las VEs secretadas por células tumorales mamarias MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 o AL inducen migración, invasión y TEM a través de la activación de las vías PI3K/Akt y ERK1/2 en células epiteliales mamarias no tumorales MCF10A.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si las VEs secretadas por células tumorales triple negativo MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 o AL inducen migración, invasión y TEM en células epiteliales MCF10A a través de las vías PI3K/Akt y ERK1/2.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar si IGF-1 promueve la migración de células MDA-MB-231 y MCF10A.
2. Caracterizar las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 y AL.
3. Evaluar si las VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen la migración e invasión de células MCF10A.
4. Determinar si las VEs provenientes de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 promueven la adquisición de marcadores mesenquimales.
5. Examinar si las VEs derivadas de células MDA-MB231 estimuladas con IGF-1 inducen la expresión de factores de transcripción relacionados a la TEM, tales como Snail1, Twist1, Sip1.
6. Analizar si las VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 o AL inducen la activación de Akt2 y Erk1/2 en células MCF10A.
7. Evaluar el papel de las vías ERK1/2 y PI3K/Akt en los procesos de migración e invasión inducido por VEs.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Anticuerpos y reactivos**

El IGF-1, la faloidina conjugada a TRITC y la mitomicina C fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los anticuerpos contra CD9 (C-4), E-cadherina (67A4), vimentina (V9), N-cadherina (13A9), Akt2 (F-7), Akt1 (SC10), FAK (c-20), MHC clase I (BRA23/9), MMP-2 (H-76), MMP-9 (H-129), el colorante Hoechst y el inhibidor LY294002 fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo contra Flotilina-2 (Flot-2) y el matrigel fueron obtenidos de BD Biosciences. El anticuerpo contra CD63 (MEM-259) fue adquirido de Abcam. Los anticuerpos contra ERK1/2, así como los anticuerpos fosfoespecíficos para la Thr-202/Tyr-204 de ERK1/2 (anti-p-ERK1/2) y para la Ser-473/Ser474 de Akt1/Akt2 (anti-p-Akt) fueron obtenidos de Cell Signaling. El anticuerpo fosfoespecífico para la Tyr-397 de FAK (anti-p-FAK) y el colorante de membrana CellMask™ Orange fueron obtenidos de Invitrogen. AL y el inhibidor A6730 fueron obtenidos de Sigma. El inhibidor de ERK1/2 (3-(2-aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4 thiazolidinedione hydrochloride, HCl) y wortmanina fueron adquiridos de Merck Millipore. El anticuerpo contra actina fue donado por el Dr. José Manuel Hernández (Cinvestav-IPN).

### **Cultivos celulares**

La línea celular MDA-MB-231 son células humanas invasivas TNBC. La línea celular MCF10A, son células inmortalizadas no transformadas de epitelio mamario. Las células de cáncer mamario MDA-MB-231 fueron cultivadas en cajas Petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos. Las células epiteliales mamarias no tumorales MCF10A fueron cultivadas en cajas de 100 y 35 mm de diámetro con medio DMEM-F12 (3:1) suplementado con 5% de SFB, 10 µg/ml de insulina, 0.5 µg/ml de hidrocortisona, 20 ng/ml de EGF recombinante y antibióticos.

Ambas líneas celulares fueron incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de oxígeno.

Las células MDA-MB-231 fueron sometidas a ayuno con DMEM sin suero durante 24 h antes de la estimulación con IGF-1 o AL, mientras que las células MCF10A se colocaron en ayuno con DMEM/F12 sin hidrocortisona, EGF, insulina y sin suero durante 18 h antes del tratamiento con inhibidores y/o VEs.

### **Estimulación de células MDA-MB-231 con IGF-1**

Cultivos de células MDA-MB-231 con confluencia del 80% fueron sometidos a ayuno con DMEM sin suero durante 24 horas. Posteriormente, los cultivos fueron lavados dos veces con PBS 1X estéril (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, a pH 7.2). En seguida, se adicionó medio fresco DMEM que contenía IGF-1 a una concentración de 10 nM durante un periodo de tiempo de 12, 24, 36 y 48 h. Concluido el tiempo de estimulación, los medios condicionados fueron colectados para la obtención de VEs.

### **Estimulación de células MDA-MB-231 con AL**

Cultivos de células MDA-MB-231 al 80% de confluencia fueron sometidos a ayuno con DMEM sin suero durante 24 h y lavados dos veces con PBS 1X estéril (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, a pH 7.2). A continuación, se les colocó medio fresco DMEM que contenía AL a una concentración de 90 µM durante 48 h. Concluido el tiempo de tratamiento, los medios condicionados fueron colectados para la obtención de VEs.

### **Aislamiento de VEs mediante centrifugación diferencial**

El aislamiento de las VEs fue llevado a cabo como se describió anteriormente (Galindo-Hernandez et al., 2014). Los medios condicionados se centrifugaron a 600 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado

a 2,000 xg durante 30 minutos, posteriormente, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 10,000 xg durante 30 minutos. Finalmente, se realizó una centrifugación a 110,000 xg durante 70 minutos a 4°C, para obtener una pastilla enriquecida en VEs. La pastilla resultante fue resuspendida en medio DMEM sin SFB y adicionado con antibióticos o en amortiguador RIPA. La concentración de proteína de las VEs se determinó mediante el método de micro-Bradford.

### **Microscopia electrónica de transmisión (MET)**

Las VEs obtenidas de medios condicionados de células MDA-MB-231 sin estímulo y VEs obtenidas de células estimuladas con IGF-1 o AL fueron resuspendidas en 100 µl de PBS 1X filtrado y estéril. Posteriormente, 10 µl de la suspensión de VEs fueron colocadas y adsorbidas durante 3-5 minutos en rejillas de cobre cubiertas con una capa de Formvar al 0.3% y estabilizadas con carbono. A continuación, las rejillas fueron expuestas durante 30 segundos sobre una gota de acetato de uranilo al 2%, el exceso de fluido fue removido utilizando papel filtro, y las rejillas se dejaron secar al aire libre. Finalmente, las rejillas fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión, modelo JEM 1400, operado a 80 kV y acoplado a una cámara digital (Olympus SIS, Alemania).

### **Estimulación de células MCF10A con VEs aisladas de células MDA-MB-231**

Cultivos confluentes de células MCF10A fueron ayunados con medio DMEM-F12 (3:1) sin suero durante 18 h. Posteriormente, los cultivos fueron lavados dos veces con PBS 1X estéril y estimulados durante diferentes tiempos con VEs derivadas de células MDA-MB-231 sin tratamiento o estimuladas con 10 nM de IGF-1 (80 µg de VEs por condición experimental). Alternativamente, las células MCF10A fueron tratadas durante distintos tiempos con VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con y sin 90 µM de AL.

## **Inmunoprecipitación**

Después del tratamiento con VEs, las células MCF10A fueron lisadas en 100 µl de RIPA (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 100 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, glicerol 10%, Triton X-100 1%, desoxicolato de sodio 1%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, SDS 0.1% y PMSF 1 mM) para obtener extractos de proteínas totales. Los lisados fueron centrifugados a 13500 xg por 12 minutos a 4°C y el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C para ensayos posteriores. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de micro-Bradford. Posteriormente, cantidades iguales de proteína fueron inmunoprecipitadas toda la noche a 4°C con la proteína A-agarosa conjuntamente con el anticuerpo monoclonal correspondiente. Los inmunoprecipitados fueron lavados 2 veces con el amortiguador RIPA y extraídos por calor con buffer de muestra durante 5 minutos.

## **Inmunodetección**

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% durante 1 hora e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (dilución 1:1000), durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos con PBS 1X-Tween al 0.05% e incubadas con el anticuerpo secundario especie-específico conjugado con HRP (dilución 1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos con PBS 1X-Tween al 0.05% y reveladas mediante quimioluminiscencia. Las auto radiografías fueron escaneadas y las bandas se cuantificaron usando el programa ImageJ v1.52p (NIH).

## PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR)

El ARN total fue obtenido utilizando la solución de TRIzol (Invitrogen). El ADNc se sintetizó usando el sistema de transcripción reversa SuperScript III a partir de 1 µg de ARN total como molde. Para la PCR en tiempo real, la expresión relativa del gen se determinó mediante el Kit iQ™ SYBR Green PCR Supermix (Bio-Rad, EE. UU.). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 1. La amplificación se realizó mediante 45 ciclos de desnaturalización secuencial a 95°C durante 2 minutos, el alineamiento a 60°C durante 15 segundos y la extensión a 72°C durante 20 segundos. Los resultados fueron analizados utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y normalizados a los datos de  $\beta$ -actina.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR

<b>Gen</b>	<b>Primer delantero 5' → 3'</b>	<b>Primer reverso 5' → 3'</b>
<i>Snail1</i>	GCGAGCTGCAGGACTCTAAT	CCTCTGTCCTCATCTGACA
<i>Twist1</i>	GGAGTCCGCAGTCTTACGAG	TGGAGGACCTGGTAGAGGAA
<i>Sip1</i>	AATGGCAACAGCAACAAGTG	CCCCGTCAGCACATAACTTT
<i>E-cadherina</i>	CGACCAACCCAAGAATCTA	AGGCTGTGCCTTCCTACAGA
<i>Vimentina</i>	GGTACTCAGTGGACTCCTGCTTT	CTGCCAACCGGAACAATGA
<i><math>\beta</math>-actina</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

## Ensayo de migración

Cultivos confluentes de células MCF10A fueron ayunados con medio DMEM-F12 (3:1) sin suero durante 18 h y tratados con mitomicina C (50 µg/ml), durante 2 h, para inhibir proliferación celular. Después del tiempo de ayuno, se realizó una rayadura o “herida” en el centro de la monocapa celular utilizando la punta de una pipeta estéril de 200 µL. Enseguida, los cultivos fueron lavados dos veces con PBS 1X para remover las células desprendidas. A continuación, las células MCF10A fueron pre-tratadas con inhibidores y/o estimuladas durante 48 horas con las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 o con VEs de



células MDA-MB-231 estimuladas con AL (~52,450 VEs por condición experimental). Posterior a las 48 h de estímulo, las células fueron fijadas con *p*-formaldehído al 4% durante 15 min y teñidas con cristal violeta al 0.2%. La migración celular dentro de la herida fue fotografiada utilizando un microscopio invertido acoplado a cámara y fue cuantificada utilizando el programa ImageJ v1.52p (NIH).

### **Zimografía en gelatina**

Las células MCF10A fueron estimuladas durante 18 y 24 h con VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1. Una vez concluido el tiempo de estímulo, los medios condicionados fueron colectados y concentrados utilizando tubos Centricon® (EDM Millipore) a 750 xg durante 2 h. La actividad proteolítica de las metaloproteinasas fue analizada en los sobrenadantes de la siguiente manera: volúmenes constantes de los medios concentrados fueron mezclados con amortiguador de carga (SDS 2.5%, sacarosa 1% y rojo de fenol 4 µg/ml) sin agentes reductores e incubados durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se cargaron en geles de poliacrilamida al 8% copolimerizados con gelatina a 1 mg/ml. La electroforesis se realizó a 4 °C durante 2 h. Posteriormente, los geles fueron lavados tres veces (30 min cada lavado) en Triton X-100 al 2.5% e incubados en amortiguador de activación enzimática (Tris- HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.4) a 37°C durante 48 h. Finalmente, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y la actividad proteolítica fue detectada como bandas claras, correspondientes a la gelatina digerida, sobre un fondo azul de sustrato no digerido. Se incluyeron los medios condicionados de células MDA-MB-231 estimulados con etanol (400 mg/dl) y PDB (100ng/ml) como controles positivos de secreción de MMP-2 y MMP-9, respectivamente.

## **Ensayo de invasión**

Los insertos de cultivo celular de placas de 24 pozos (Costar, Corning, Inc) se cubrieron con 50  $\mu$ L de Matrigel BD (3 mg/ml) durante 2 h a 37°C. A continuación, se sembraron  $1 \times 10^5$  células MCF10A en DMEM/F12 sin suero, colocadas sobre el Matrigel de cada inserto (parte superior). En la parte inferior de la cámara se colocaron las VEs en 600  $\mu$ l de medio DMEM/F12 sin suero con las diferentes condiciones de estimulación y se incubaron durante 72 h a 37°C. Posteriormente, el medio de los dos compartimentos, las células que no invadieron y el Matrigel de la parte superior de la membrana fueron retirados con hisopos de algodón. Las células que invadieron quedaron en la superficie inferior de la membrana y fueron lavadas con PBS y fijadas con p-formaldehído al 4% durante 12 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células que invadieron fueron fotografiadas y cuantificadas mediante la tinción con cristal violeta al 0.5% durante 15 min, el colorante se eluyó con 300  $\mu$ l de ácido acético al 30% y se midió absorbancia a 600 nm de la solución obtenida. Los resultados se graficaron como promedio de las absorbancias. Las células tratadas con SFB al 5% se incluyeron como control de invasión.

## **Microscopia confocal de inmunofluorescencia**

Las células MCF10A se cultivaron en cubreobjetos, una vez confluentes, se lavaron con PBS 1X, se equilibraron en DMEM y se trataron durante 2 h con 12  $\mu$ M de mitomicina C. Posteriormente, se realizó una rayadura en el centro de la monocapa, enseguida, los cultivos celulares fueron lavados con PBS 1X, equilibrados con DMEM/F12 sin suero y tratados durante 48 h a 37°C con VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1. Después de la incubación, las células se fijaron con p-formaldehído (4%) durante 20 min, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% durante 20 min y después se bloquearon con SFB al 10% durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron durante 12 h a 4°C con el anticuerpo anti-vimentina (1:100), seguido de la incubación durante 2 horas a 4°C con el anticuerpo secundario anti-mouse

marcado con FITC. La tinción de actina fibrilar se realizó mediante la incubación de células durante 1 h a temperatura ambiente con faloidina conjugada con TRITC, y el núcleo fue teñido con el colorante Hoechst durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se analizaron mediante microscopía confocal (Modelo TCS SP2; Leica Microsystems, Inc) utilizando el software ImageJ v 1.52e (NIH).

### **Ensayo de captura de VEs mediante microscopia confocal**

Las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 estimuladas con o sin IGF-1 fueron teñidas con el colorante lipofílico fluorescente CellMask™ Orange Plasma Membrane Stain (Invitrogen) disuelto en DMEM sin suero (2.5 µg/ml) durante 30 min a 4°C, en seguida se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 110,000 xg durante 70 min a 4°C. Las VEs se reconstituyeron en 100 µl de DMEM sin suero. Posteriormente, VEs sin teñir y VEs teñidas fueron incubadas durante 20 min a 37°C en células MCF10A en presencia o ausencia de inhibidores. Después de la incubación, las células MCF10A se lavaron dos veces con PBS 1X, se fijaron con p-formaldehído al 4%, durante 20 min a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente con PBS 1X. A continuación, las células fueron contrateñidas con Hoechst durante 20 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron examinadas mediante microscopía confocal (Modelo TCS SP2; Leica Microsystems, Inc). Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ v 1.52e (NIH).

### **Ensayo de captura de VEs mediante citometría de flujo**

Las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL fueron pre-incubadas con el colorante lipofílico fluorescente CellMask™ Orange Plasma Membrane Stain (Invitrogen) disuelto en DMEM sin suero (2.5 µg/ml) durante 30 min. A continuación, las VEs fueron lavadas con PBS 1X, centrifugadas a 110,000 g durante 70 minutos y las pastillas fueron resuspendidas en 100 µl de DMEM sin

suero. Posteriormente, las células MCF10A fueron estimuladas durante 30 min, 1 y 4 h con VEs marcadas con CellMask™, en presencia o ausencia de inhibidores. Finalizado el tiempo de estimulación, las células MCF10A fueron lavadas dos veces con PBS 1X, fijadas con *p*-formaldehído al 4%, tripsinizadas y resuspendidas en 300 µl de PBS 1X para ser analizadas con el citometro de flujo Fortessa (Dako Cytomation). Para su análisis fueron registrados 10,000 eventos por condición. El análisis fue realizado con Attune® Cytometric Software v 2.1.0.8626.

### **ARN de interferencia**

La expresión de Akt2 en células MCF10A fue silenciada mediante el kit “Silencer siRNA” adquirido de Santa Cruz Biotechnology (0.3 µM de Akt2 siRNA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Así mismo, fue incluido un control inespecífico de siRNA (0.3 µM de scramble siRNA).

### **Análisis estadístico**

Se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada ensayo. Los datos fueron analizados usando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey, mediante el software GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, EE. UU). Todos los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar (DE). La probabilidad estadística por debajo de  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,001$  (\*\*\*) se consideró significativa.

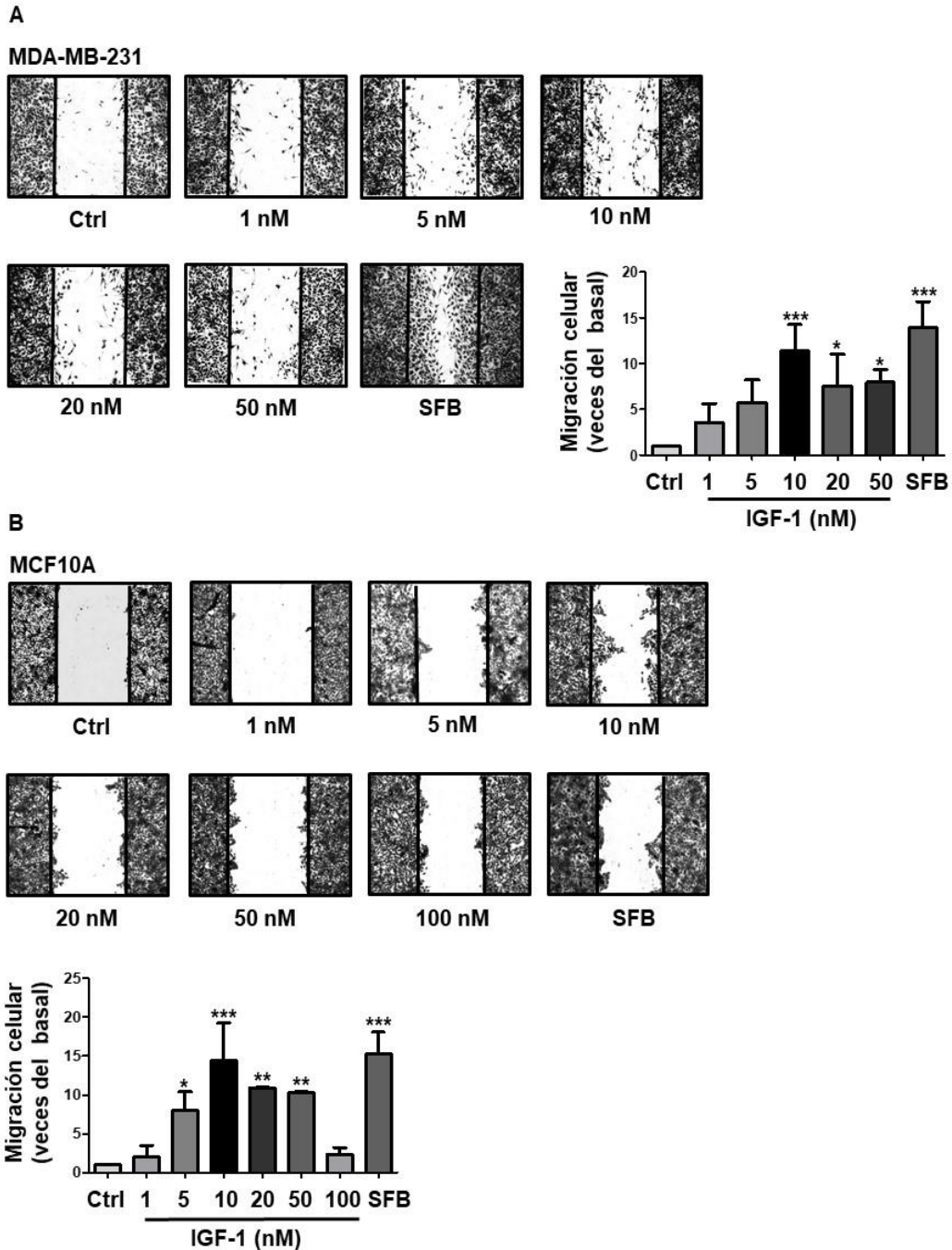
## **RESULTADOS**

Las VEs son secretadas por diferentes tipos de células bajo condiciones fisiológicas o patológicas como el cáncer. Juegan un papel importante en la progresión tumoral, induciendo procesos como la proliferación, la migración, la invasión y la TEM (Latifkar et al., 2018, Ciardiello et al., 2016). Estudios recientes proveen evidencia que la secreción de VEs se lleva a cabo de manera normal y en respuesta a diferentes estímulos (Colombo et al., 2014). En el presente trabajo evaluamos la participación de las VEs derivadas de células tumorales mamarias MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 o AL en los procesos de migración, invasión, TEM y la activación de vías involucradas en dichos procesos.

### **I. Resultados de VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1**

#### **IGF-1 induce migración de células MDA-MB-231 y MCF10A**

Estudios previos señalan que IGF-1 induce migración en diferentes tipos de células cancerosas (Walsh and Damjanovski, 2011, Taliaferro-Smith et al., 2015, Wang et al., 2016, Rigracciolo et al., 2020). Sin embargo, estos estudios reportan diferentes concentraciones de IGF-1. Por lo tanto, primero determinamos la concentración a la cual IGF-1 induce migración en células MDA-MB-231 y en células MCF10A. Con la finalidad de evaluar el efecto de IGF-1 en la migración celular, cultivos confluentes de células MDA-MB-231 y MCF10A fueron tratados durante 48 h con concentraciones crecientes (1, 5, 10, 20, 50 y 100 nM) de IGF-1. La migración celular se evaluó mediante ensayos de cierre de herida. Los resultados indicaron que el tratamiento con 10, 20 y 50 nM de IGF-1 indujo migración de células MDA-MB-231 y MCF10A, siendo el tratamiento con 10 nM el que indujo un incremento pronunciado en ambas líneas celulares (Fig. 5A y B). Por consiguiente, nuestro principal objetivo fue evaluar si las VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con 10 nM de IGF-1 inducen un proceso de TEM en células MCF10A.



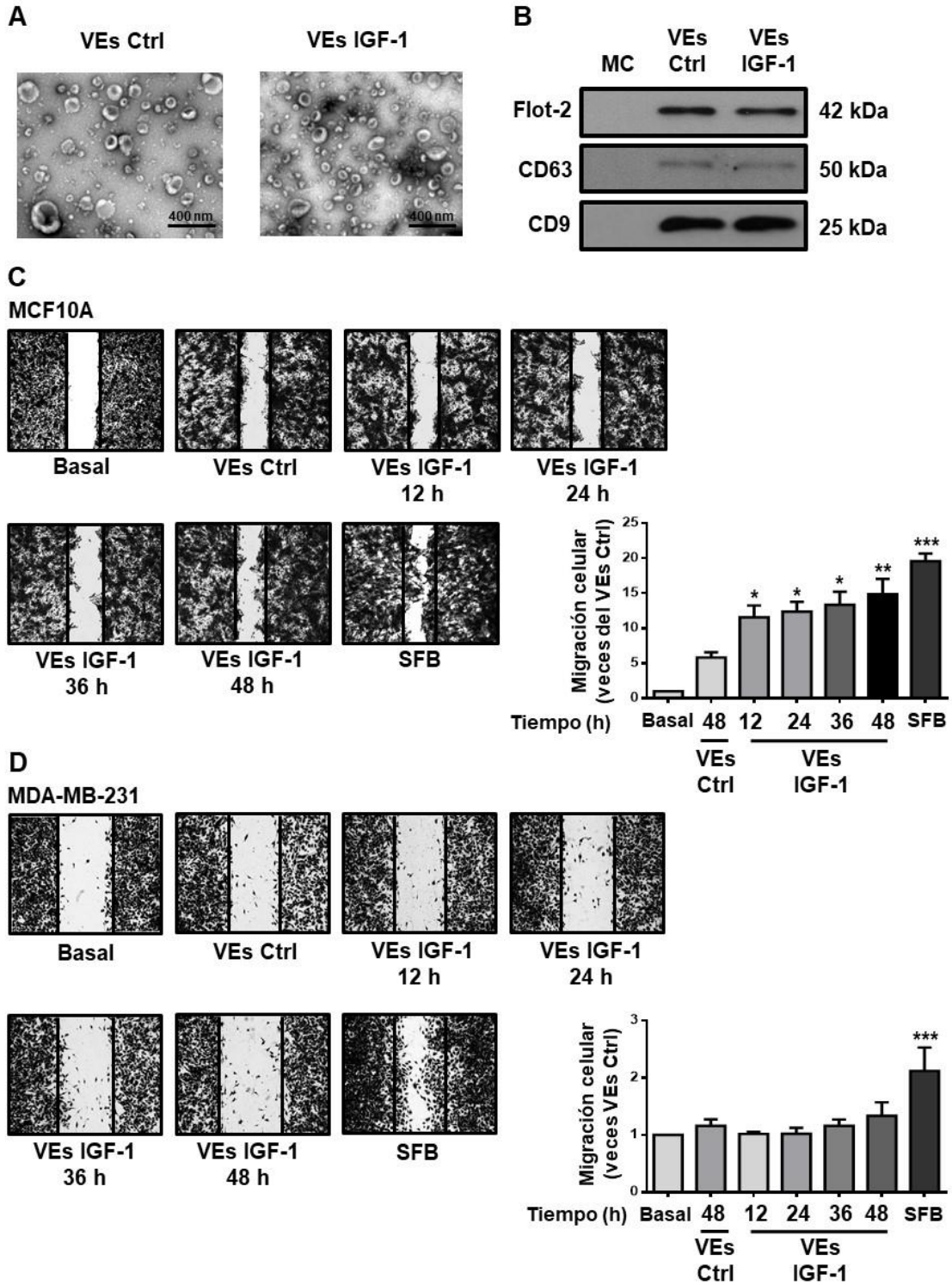
**Figura 5. IGF-1 induce migración en células MDA-MB-231 y MCF10A. (A y B)** Ensayos de cierre de herida. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 y MCF10A fueron pre-tratadas con 12  $\mu$ M de mitomicina C durante 2 h. Posteriormente, se realizó una rayadura en la monocapa. Las células fueron tratadas con 1, 5, 10, 20, 50 y 100 nM de IGF-1. Se incluyó un control de migración (SFB). Las gráficas representan la media  $\pm$  DE e indican el número de veces de incremento de la migración con respecto al valor de células sin tratamiento (Ctrl). Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con el Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## **VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen migración de células MFC10A**

En primer lugar, las VEs obtenidas de células MDA-MB-231 sin tratamiento (VEs Ctrl) y las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con 10 nM de IGF-1 (VEs IGF-1) fueron obtenidas por centrifugación diferencial y caracterizadas mediante MET y WB. Las imágenes obtenidas por MET, utilizando el método de tinción negativa, identificaron VEs con tamaños entre 50 y 500 nm tanto en las VEs Ctrl y en las VEs IGF-1, mientras que los ensayos de WB mostraron la presencia de Flot-2, CD63 y CD9, los cuales son marcadores de VEs (Fig. 6A y B).

El proceso de TEM es activado de manera aberrante durante la progresión tumoral, esto permite a las células migrar e invadir tejidos circundantes y lejanos para su entrada a vasos sanguíneos y linfáticos. Con la finalidad de evaluar el papel de las VEs IGF-1 en la migración celular, cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron estimulados con 10 nM de IGF-1 durante 12, 24, 36 y 48 h. Posteriormente, los medios condicionados fueron colectados y las VEs fueron aisladas de cada una de las condiciones. En seguida, las células MCF10A fueron tratadas con las VEs IGF-1 y VEs Ctrl. La migración celular se evaluó mediante ensayos de cierre de herida 48 h después del tratamiento con las VEs. Los resultados mostraron que las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con 10 nM de IGF-1 durante 12-48 h indujeron la migración de células MCF10A, en contraste las VEs Ctrl no promovieron migración celular (Fig. 6C). De manera que, nuestros experimentos posteriores fueron realizados con VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 durante 48 h.

Con el fin de evaluar si las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen la migración de células MDA-MB-231. Se realizaron ensayos de cierre de herida durante 48 h con células MDA-MB-231 tratadas con VEs Ctrl y VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con 10 nM de IGF-1 durante 12, 24, 36 y 48 h. Los resultados demostraron que las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con 10 nM de IGF-1 durante 12-48 h no indujeron la migración de células MDA-MB-231 (Fig. 6D).



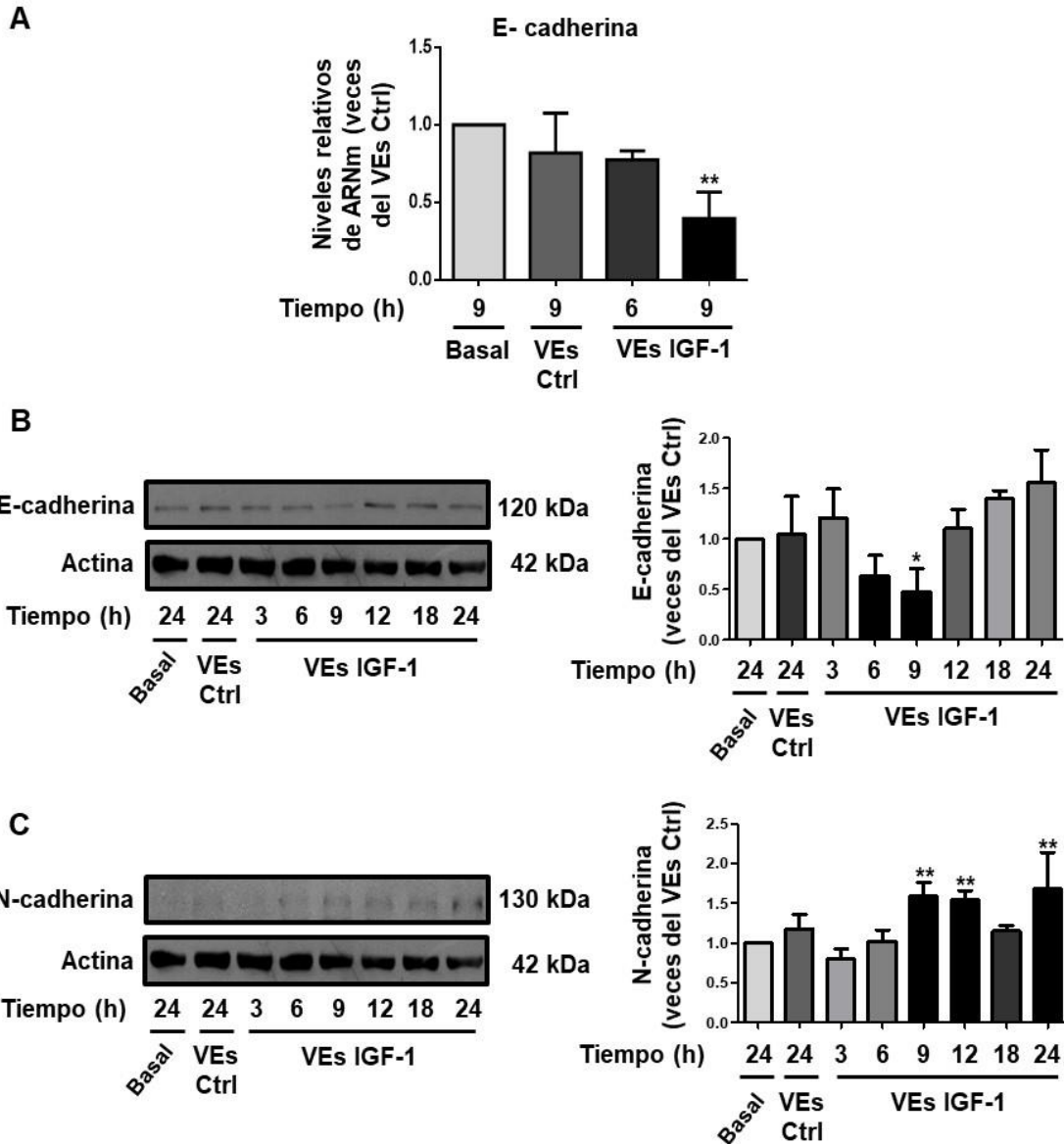
**Figura 6. VEs IGF-1 inducen migración de células MCF10A. (A y B)** Caracterización de VEs obtenidas de células MDA-MB-231 sin tratamiento (VEs Ctrl) y VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con 10 nM de IGF-1 durante 48 h (VEs IGF-1) por medio de MET y WB utilizando



anticuerpos anti-Flot-2, anti-CD63 y anti-CD9. Se incluyó un control de medio condicionado (MC) libre de VEs. **(C y D)** Ensayos de migración. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 y MCF10A fueron pre-tratadas con 12  $\mu$ M de mitomicina C durante 2 h, posteriormente se realizó una rayadura en el centro de la monocapa y las células MCF10A y MDA-MB-231 fueron tratadas durante 48 h con VEs Ctrl y VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con 10 nM de IGF-1 durante 12, 24, 36 y 48 h. Se incluyó un control de células MCF10A y MDA-MB-231 sin tratamiento con VEs (Basal) y un control de migración (SFB). Los gráficos representan la media  $\pm$  DE e indican el número de veces de incremento de la migración por encima del valor de VEs Ctrl. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas con las VEs Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### **VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 regulan la expresión de E-cadherina y N-cadherina**

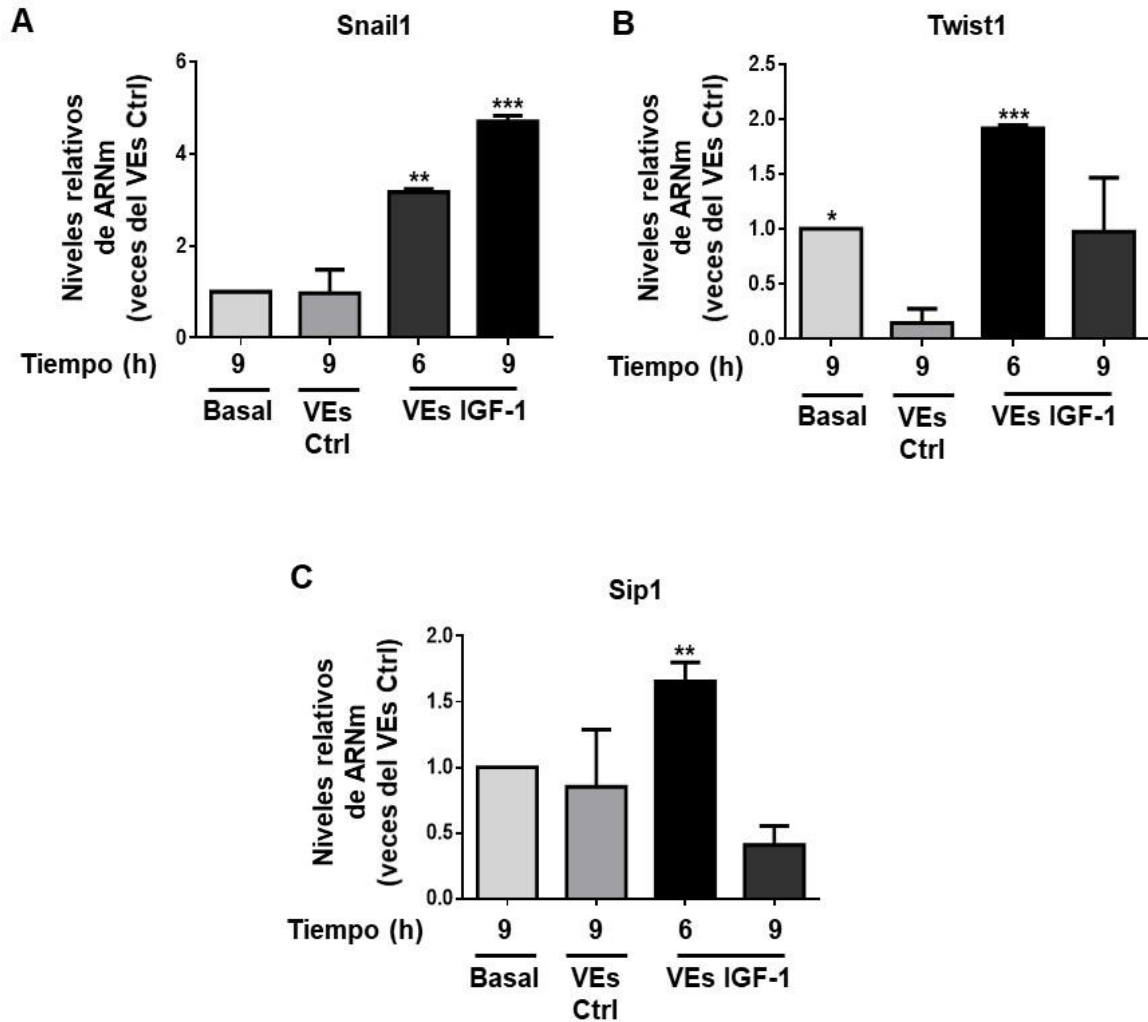
El proceso de TEM es caracterizado por la disminución de la expresión del marcador epitelial E-cadherina y el incremento del marcador mesenquimal N-cadherina (Dongre and Weinberg, 2019). Por tanto, analizamos si las VEs IGF-1 inducen cambios en la expresión de estas proteínas en las células MCF10A. Para tal propósito, cultivos confluentes de células MCF10A fueron tratadas durante diferentes periodos de tiempo con VEs Ctrl y VEs IGF-1. Finalizado el tiempo de estímulo, se obtuvo el ARN total y los lisados celulares. El ARN total fue analizado por medio de RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para E-cadherina y los lisados celulares fueron examinados mediante WB utilizando los anticuerpos anti-E-cadherina y anti-N-cadherina. Los resultados obtenidos mostraron que únicamente las VEs IGF-1 indujeron una disminución en los niveles de ARNm de E-cadherina a las 9 h de tratamiento en las células MCF10A (Fig. 7A). Del mismo modo, las VEs IGF-1 disminuyeron transitoriamente la expresión de E-cadherina a las 9 h y promovieron un incremento transitorio en la expresión de N-cadherina a las 9, 12 y 24 h de tratamiento comparado con células MCF10A tratadas con VEs Ctrl (Fig. 7B y C).



**Figura 7. VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 regulan la expresión de E-cadherina y N-cadherina.** Las células MCF10A fueron estimuladas durante distintos tiempos con VEs Ctrl y VEs IGF-1, posteriormente se obtuvo el ARN total o los lisados celulares. **(A)** Análisis de los niveles de ARNm de E-cadherina mediante RT-qPCR. **(B y C)** Los lisados de células MCF10A fueron analizados por WB con anti-E-cadherina y anti-N-cadherina. Adicionalmente, las membranas fueron evaluadas con el anticuerpo anti-actina como control de carga. Se incluyó un control de células MCF10A sin tratamiento con VEs (Basal). Los gráficos representan la media  $\pm$  DE e indican el número de veces de incremento/disminución de la expresión de E-cadherina y N-cadherina con respecto a los valores de VEs Ctrl. Los asteriscos denotan comparaciones realizadas a las VEs Ctrl. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## **VEs de células MDA-MB-231 estimuladas IGF-1 inducen la expresión de los represores transcripcionales de E-cadherina**

La TEM es un proceso complejo orquestado por un grupo de factores de transcripción incluyendo Snail1, Sip1 y Twist1, los cuales juegan un papel importante reprimiendo la expresión de E-cadherina e induciendo la expresión de marcadores mesenquimales (Lu and Kang, 2019). Para determinar si las VEs IGF-1 inducen la expresión de los represores transcripcionales de E-cadherina en células MCF10A, los niveles de ARN, obtenidos de células MCF10A tratadas durante 6 y/o 9 h con las VEs Ctrl y VEs IGF-1, fueron analizados mediante RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para Snail1, Twist1 y Sip1. Los resultados indicaron que el tratamiento con VEs IGF-1 en células MCF10A estimuló un aumento en los niveles de expresión de ARNm de Snail1 a las 6 y 9 h, así mismo indujo un incremento de los niveles de ARNm de Twist1 y Sip1 a las 6 h (Fig. 8A-C).

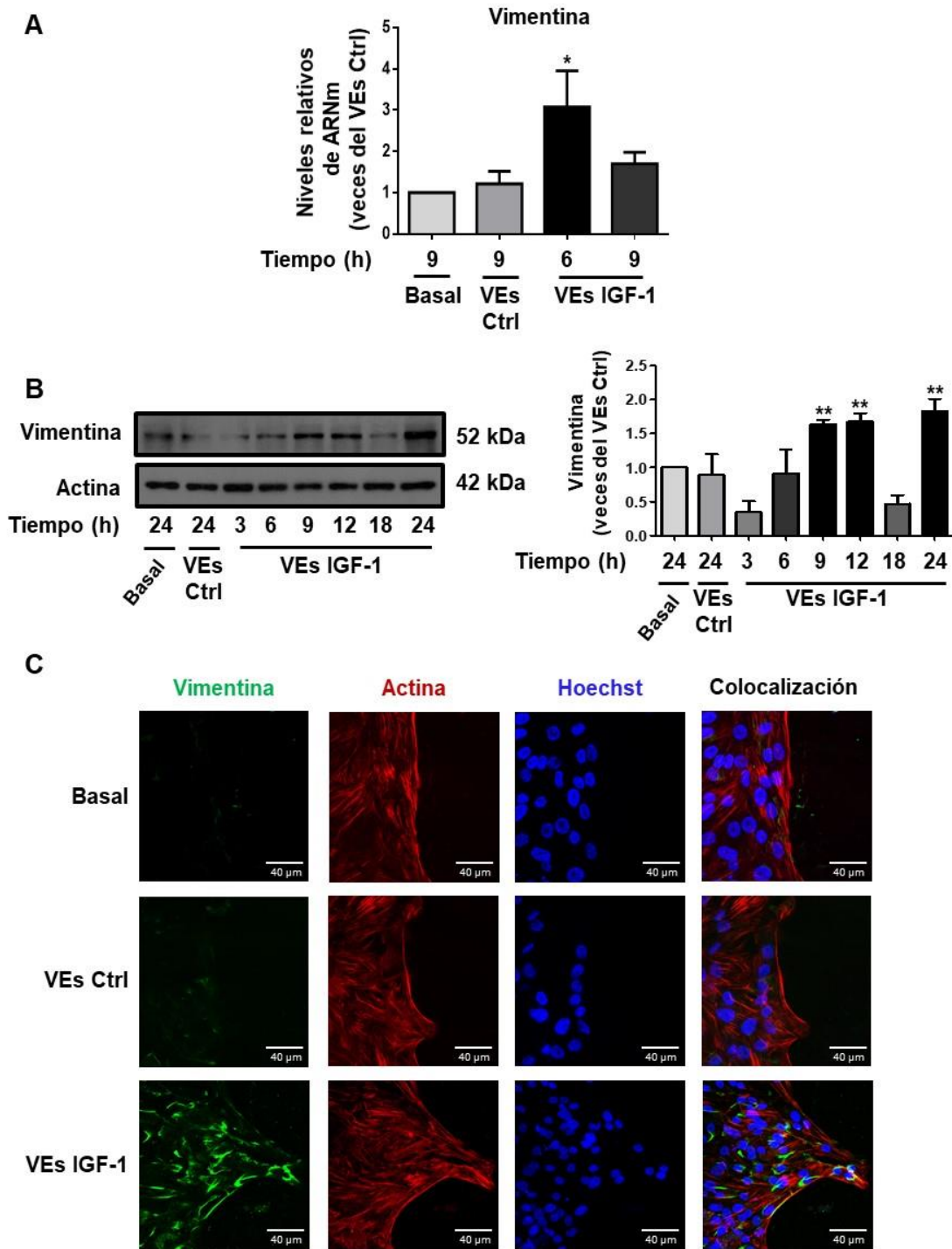


**Figura 8. VEs de células MDA-MB-231 estimuladas IGF-1 inducen un incremento de los represores transcripcionales de E-cadherina.** Cultivos confluentes de células MCF10A fueron tratados durante 6 y/o 9 h con VEs Ctrl y VEs IGF-1, posteriormente se obtuvo el ARN total. (A-C) Cuantificación de los niveles de ARNm de Snail1, Twist1 y Sip1 mediante ensayos de RT-qPCR. Se incluyó un control de células MCF10A sin tratamiento con VEs (Basal). Los gráficos representan la media  $\pm$  DE y muestran el número de veces de incremento con respecto a los valores de VEs Ctrl. Los asteriscos representan comparaciones hechas a células estimuladas con VEs Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## **VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 incrementan la expresión de vimentina**

Debido a que la expresión de vimentina está asociada con el proceso de TEM (Dongre and Weinberg, 2019). Evaluamos si el tratamiento con VEs IGF-1 induce un aumento de la expresión de vimentina en células MCF10A. Con esta finalidad, obtuvimos y cuantificamos niveles de ARN total y lisados de células MCF10A tratadas con VEs Ctrl y VEs IGF-1. La expresión de vimentina se analizó mediante RT-qPCR y WB. Como se muestra en la Fig. 9A y B, a diferencia de las VEs Ctrl, el tratamiento con las VEs IGF-1 indujo un incremento de los niveles de expresión del ARNm de vimentina a las 6 h, y además aumentó la expresión de la proteína a las 9, 12 y 24 h de tratamiento en las células MCF10A.

Para corroborar que las VEs IGF-1 incrementan la expresión de vimentina, las células MCF10A fueron cultivadas sobre cubreobjetos, en seguida se realizaron ensayos de cierre de herida y finalmente fueron estimuladas durante 48 h con VEs Ctrl y VEs IGF-1. La expresión de vimentina fue analizada mediante microscopia confocal utilizando el anticuerpo anti-vimentina. Como se ilustra en la Fig. 9C, las células MCF10A tratadas con VEs Ctrl presentaron una baja expresión de vimentina, en cambio las VEs IGF-1 incrementaron notablemente la expresión de vimentina, la cual se localizó principalmente en las células migratorias.



**Figura 9.** VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen un aumento de la expresión de vimentina. Las células MCF10A fueron tratadas durante diferentes periodos de tiempo con VEs Ctrl y VEs IGF-1 y se obtuvo el ARN total o lisados celulares. **(A)** Análisis de los niveles del ARNm de vimentina mediante RT-qPCR. **(B)** Análisis de los lisados de células MCF10A mediante WB con los anticuerpos anti-vimentina y anti-actina (control de carga). Se realizaron

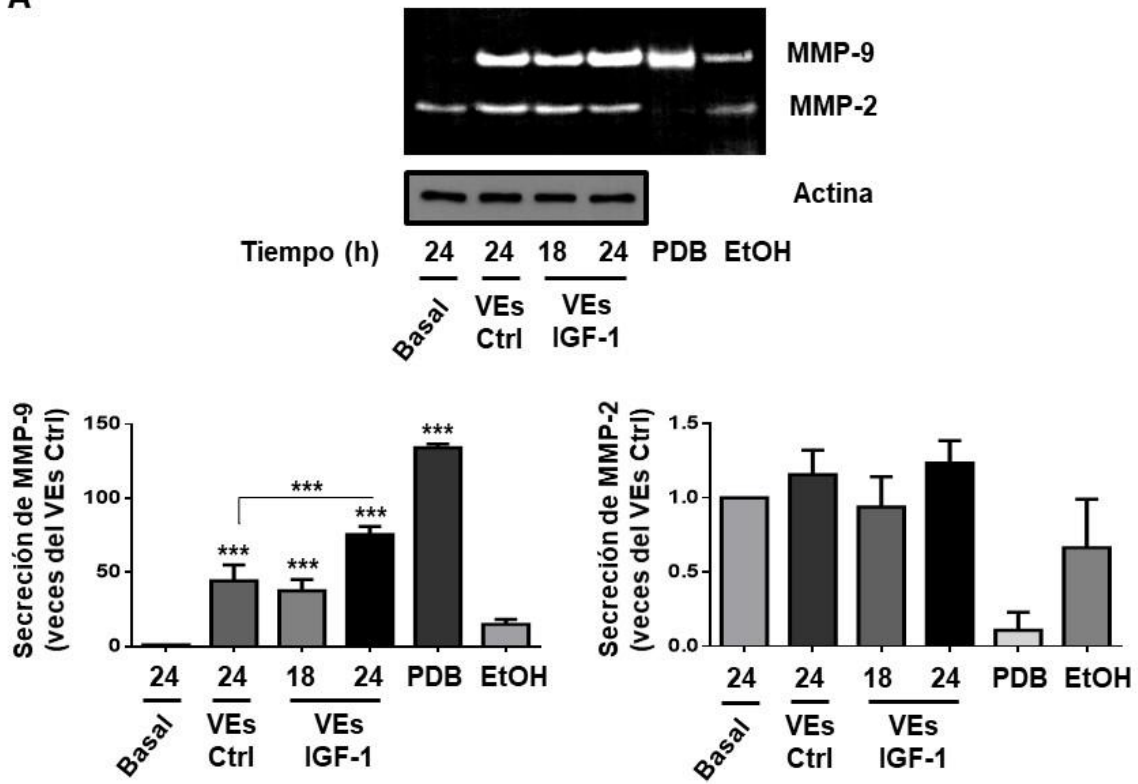
comparaciones con células estimuladas con VEs Ctrl. El gráfico representa la media  $\pm$  DE e indica el aumento de vimentina por encima del valor de VEs Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . (C) Análisis de la expresión de vimentina en ensayos de cierre de herida mediante microscopía confocal. Las células MCF10A fueron cultivadas en cubreobjetos, en seguida se realizó una rayadura en la monocapa y fueron estimuladas durante 48 h con VEs Ctrl y VEs IGF-1. Finalmente, las células fueron fijadas e incubadas con los anticuerpos anti-vimentina, faloidina conjugada con TRITC y los núcleos se tiñeron con el colorante Hoechst. Las muestras se analizaron usando microscopía confocal. Se incluyó un control de células MCF10A sin tratamiento con VEs (Basal). Barra de escala = 40  $\mu$ m.

### **VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen un incremento de la secreción de la MMP-9 e invasión**

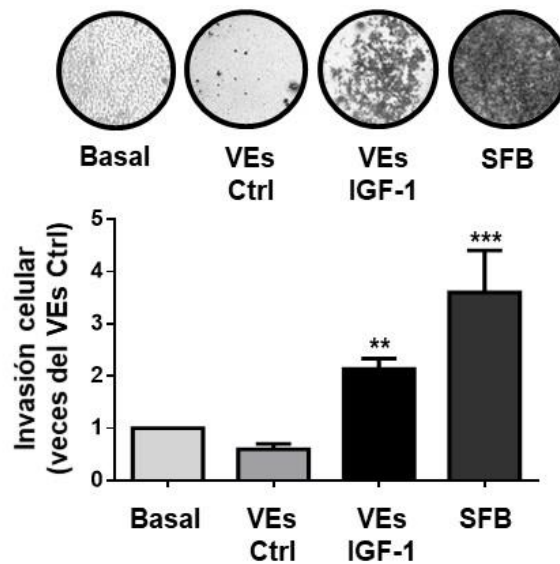
La secreción de MMPs es otro proceso característico de la TEM (Lamouille et al., 2014). Por esta razón, determinamos si las VEs IGF-1 inducen la secreción de la MMP-2 y MMP-9 en células MCF10A. Con este propósito, colectamos los medios condicionados de células MCF10A estimuladas con VEs Ctrl y VEs IGF-1 durante diferentes tiempos. La secreción de MMP-2 y MMP-9 fue evaluada mediante ensayos de zimografía en gelatina. Los resultados obtenidos mostraron que las VEs Ctrl y las VEs IGF-1 inducen únicamente la secreción de la MMP-9, interesantemente el tratamiento durante 24 h con VEs IGF-1 promueve un incremento de la secreción de MMP-9 (Fig. 10A).

La invasión celular es una característica bien conocida de la TEM (Thiery et al., 2009, Gavert and Ben-Ze'ev, 2008). Para evaluar si las VEs IGF-1 promueven invasión de células MCF10A, realizamos ensayos de invasión en cámaras de Boyden recubiertas con matrigel. Las células MCF10A fueron tratadas durante 72 h con VEs Ctrl y VEs IGF-1. Como es evidente en la Fig. 10B, las células MCF10A adquirieron una capacidad invasiva tras el estímulo con VEs IGF-1.

A



B



**Figura 10. VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen un incremento de la secreción de MMP-9 e invasión. (A)** Análisis de la secreción de MMPs mediante zimografía. Las células MCF10A fueron tratadas durante diferentes tiempos con VEs Ctrl y VEs IGF-1, después los medios condicionados y los lisados celulares fueron obtenidos. Los medios condicionados fueron

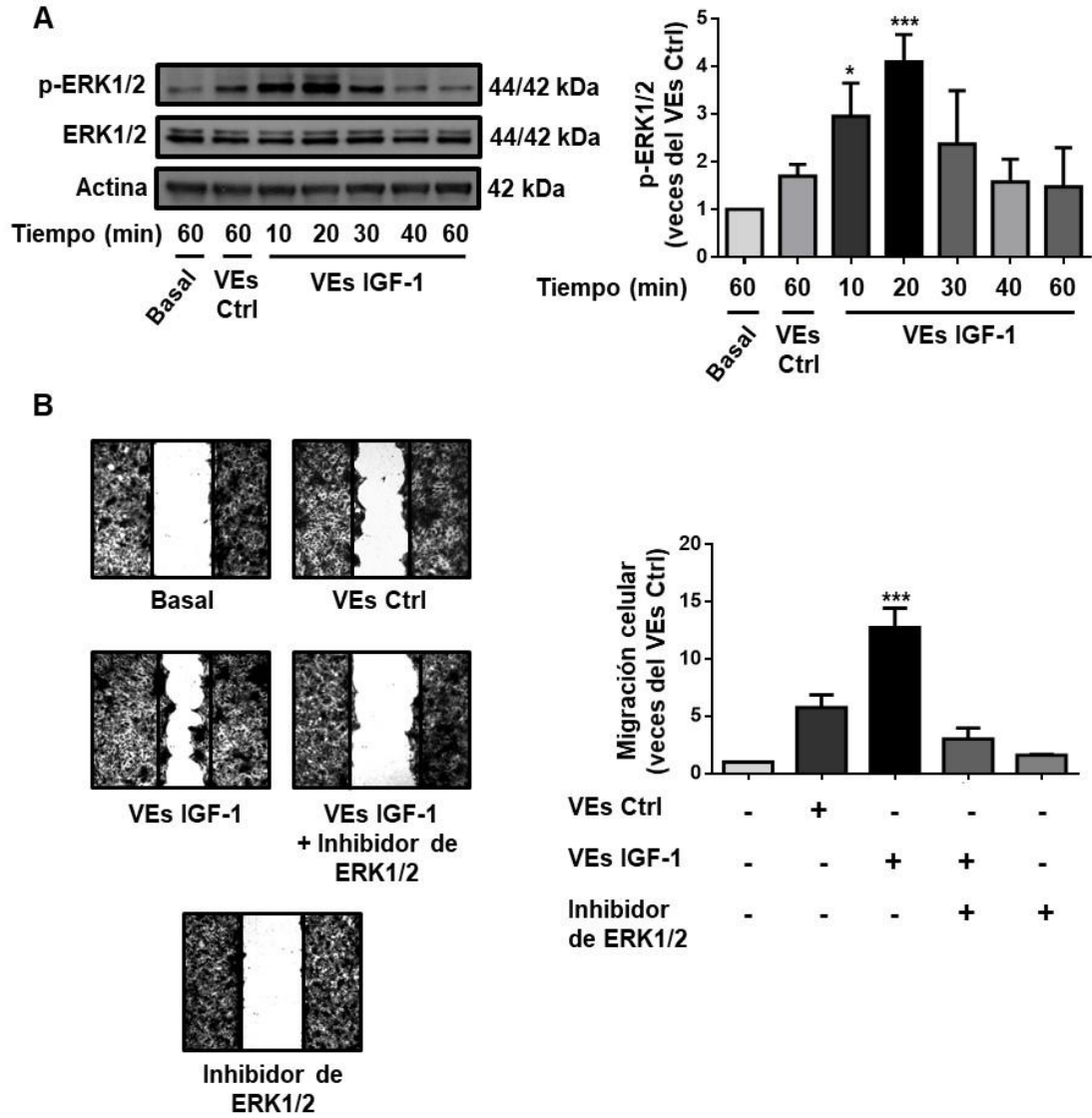


concentrados por centrifugación y la secreción de MMP-2 y MMP-9 se analizó mediante zimografía en gelatina. Los lisados celulares fueron analizados mediante WB con el anticuerpo anti-actina, para confirmar que un número similar de células MCF10A se estimuló con VEs Ctrl y VEs IGF-1. Se incluyeron controles positivos de la secreción de MMP-2 (EtOH) y de MMP-9 (PDB). **(B)** Ensayos de invasión utilizando cámaras de Boyden recubiertas con matrigel. Las células MCF10A fueron tratadas durante 72 h con VEs Ctrl y VEs IGF-1. Se incluyó un control de células MCF10A sin tratamiento con VEs (Basal) y un control positivo de invasión (SFB). Los gráficos representan la media  $\pm$  DE e indican las veces del incremento de la secreción de MMPs o invasión con respecto a los valores del Basal y de VEs Ctrl. **\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .**

### **VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen migración a través de ERK1/2**

La vía de ERK1/2 regula diferentes procesos que participan en la progresión tumoral, tal como la TEM (Guo et al., 2020). Para analizar la capacidad de las VEs IGF-1 de inducir la activación de ERK1/2. Las células MCF10A se trataron durante distintos periodos de tiempo con VEs Ctrl y VEs IGF-1, posteriormente las células fueron lisadas. Los lisados se analizaron mediante WB con el anticuerpo anti-p-ERK1/2 que reconoce los sitios de fosforilación en los residuos Thr-202 y Tyr-204, los cuales median la activación de ERK1/2. Los resultados revelaron que comparado con las VEs Ctrl, las VEs IGF-1 indujeron un incremento de la fosforilación de ERK1/2 en Thr-202 y Tyr-204, alcanzando un máximo de activación a los 20 min de tratamiento (Fig. 11A).

Teniendo en cuenta que las VEs IGF-1 indujeron migración y la activación de ERK1/2 en las células MCF10A, a continuación, se evaluó el papel de ERK1/2 en la migración. Con este fin, cultivos confluentes de células MCF10A fueron pretratadas durante 1 h con un inhibidor específico de ERK1/2, en seguida, se realizaron ensayos de cierre de herida y las células fueron estimuladas con VEs Ctrl y VEs IGF-1 durante 48 h. En la Fig. 11B, se observa que la migración inducida por las VEs IGF-1 en las células MCF10A no fue evidente en presencia del tratamiento con el inhibidor de ERK1/2.

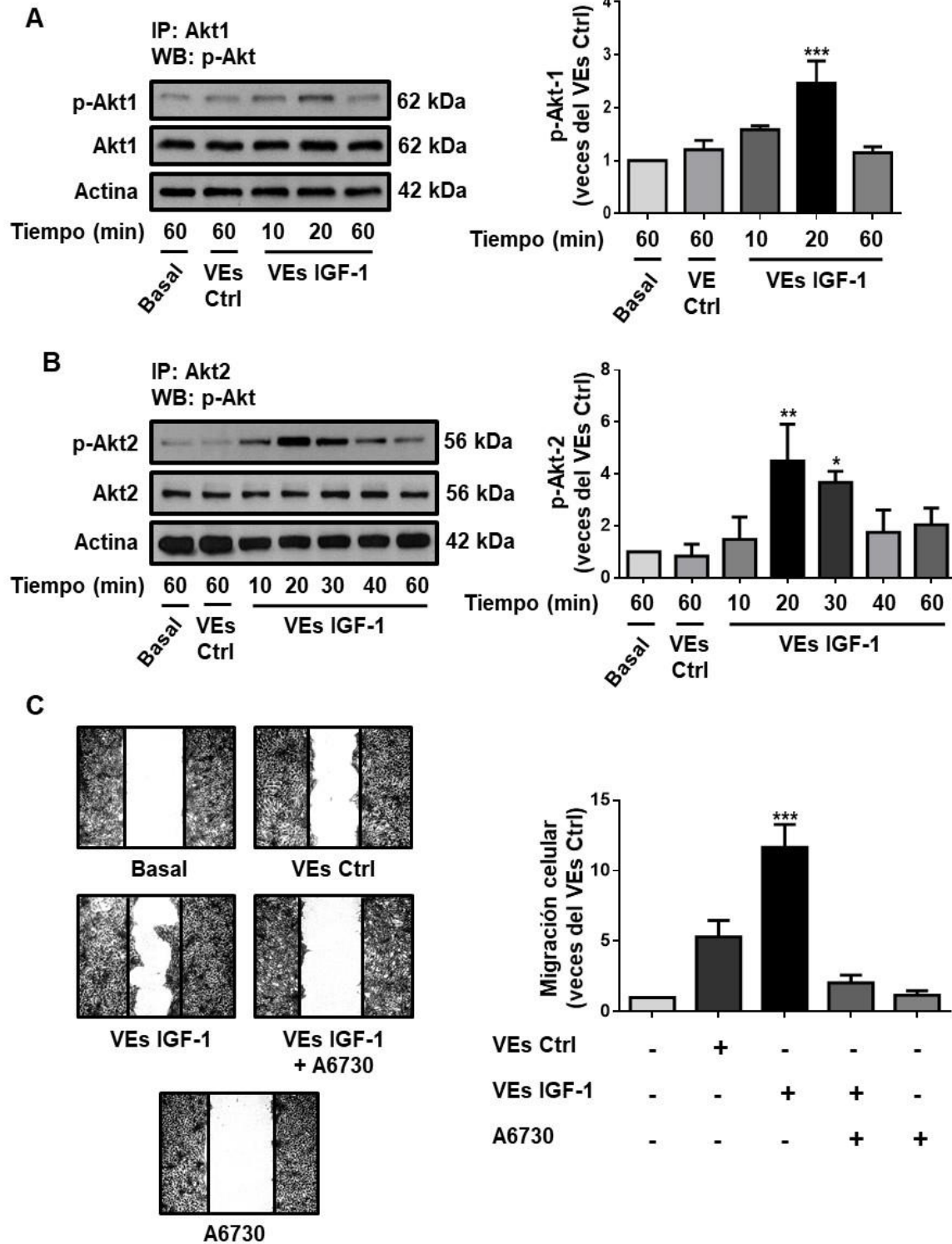


**Figura 11. VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen migración a través de ERK1/2.** (A) Los lisados de células MCF10A tratadas con VEs Ctrl y VEs IGF-1 durante 10, 20, 30, 40 y 60 min fueron evaluados por medio de WB con los anticuerpos anti-p-ERK1/2-Thr-202-Tyr-204, anti-ERK1/2 y anti-actina (control de carga). (B) Ensayos de migración realizados con células MCF10A pretratadas durante 1 h con 50 nM del inhibidor de ERK1/2, posteriormente se estimularon durante 48 h con VEs Ctrl y VEs IGF-1. Se incluyó un control de células MCF10A sin tratamiento con VEs (Basal). Los gráficos representan la media  $\pm$  DE e indican el incremento de p-ERK1/2 y de la migración por encima de los valores de VEs Ctrl. Los asteriscos demuestran comparaciones realizadas con VEs Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## **VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen migración a través de Akt**

En cáncer, frecuentemente hay una activación aberrante de la señalización de diferentes proteínas, incluyendo Akt1 y Akt2, para promover migración celular. Por lo que en este trabajo analizamos si las VEs IGF-1 inducen la activación de Akt1 y Akt-2, la cual está mediada por la fosforilación en el residuo Ser-473 (p-Akt1) y Ser-474 (p-Akt2). Con este propósito, los lisados de células MCF10A estimuladas durante diferentes tiempos con VEs Ctrl y VEs IGF-1 fueron inmunoprecipitados (IP) utilizando el anticuerpo anti-Akt1 o anti-Akt2, enseguida fueron analizados por medio de WB con el anticuerpo anti-p-Akt. Los resultados mostraron que a diferencia de las VEs Ctrl, el tratamiento con VEs IGF-1 indujo la fosforilación de Akt1 en Ser-473 y de Akt2 en Ser-474 en las células MCF10A, alcanzando un máximo de activación a los 20 min (Fig. 12A y B).

Con la finalidad de evaluar el papel de Akt1/2 en la migración celular inducida por las VEs IGF-1, se realizaron ensayos de cierre de herida en células MCF10A pretratadas durante 1 h con un inhibidor específico de Akt1/2, denominado A6730. A continuación, las células fueron estimuladas durante 48 h con VEs Ctrl y VEs IGF-1. Los resultados mostraron que el tratamiento con el inhibidor A6730 impidió completamente la migración inducida por las VEs IGF-1 en las células MCF10A (Fig. 12C).

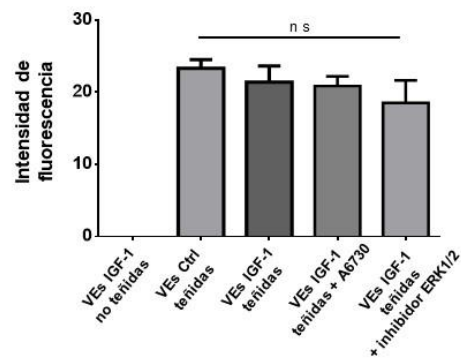
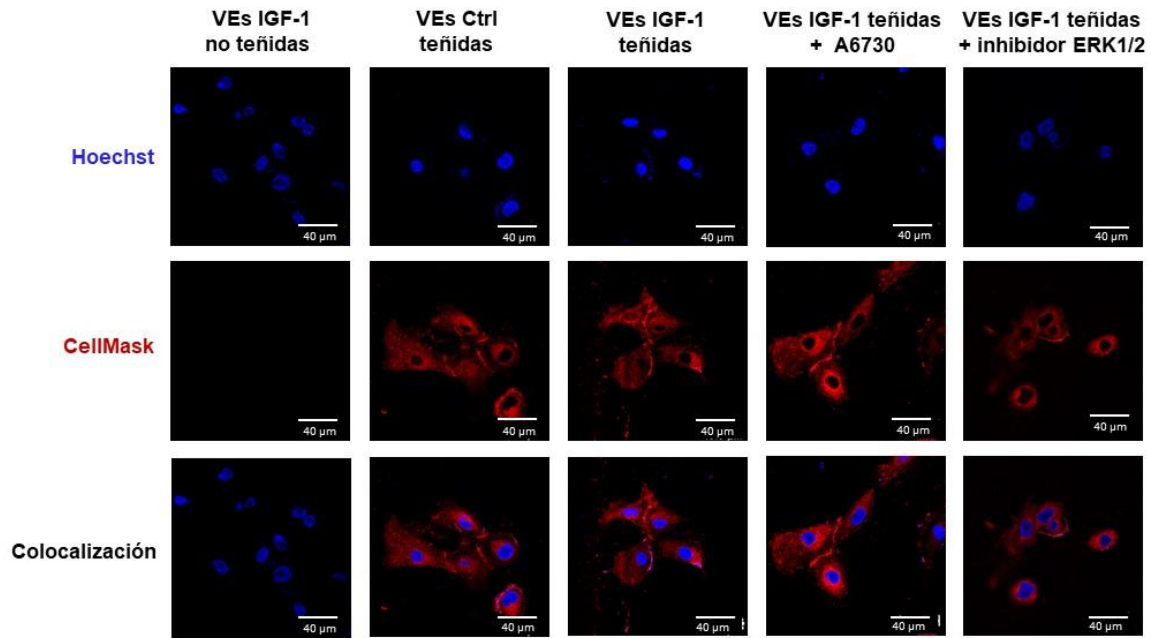


**Figura 12. VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen migración a través de la actividad de Akt.** (A y B) Los lisados de células MCF10A tratadas con VEs Ctrl y VEs IGF-1 durante 10, 20, 30, 40 y 60 min fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-Akt1 o anti-Akt2, posteriormente fueron examinados mediante WB con el anticuerpo anti-p-Akt-Ser473/474. Adicionalmente, las membranas fueron evaluadas con los anticuerpos anti-Akt1, anti-Akt2 y anti-actina como controles de carga. (B) Ensayos de migración realizados con células MCF10A pretratadas durante 1 h con 2  $\mu$ M de A6730 (inhibidor de Akt1/2), a continuación, fueron estimuladas con VEs Ctrl y VEs IGF-1 durante 48 h. Se incluyó un control de células MCF10A sin tratamiento con VEs (Basal). Los gráficos representan la media  $\pm$  DE e indican el incremento de p-Akt, p-Akt2 y de la migración con respecto al valor de VEs Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### **Las VEs liberadas de células MDA-MB-231 sin tratamiento y estimuladas con IGF-1 son capturadas por las células MCF10A**

A continuación, estudiamos si las células MCF10A capturan VEs Ctrl y VEs IGF-1, por consiguiente, las VEs Ctrl y VEs IGF-1 fueron teñidas durante 30 min con el colorante fluorescente CellMask™, enseguida, las células MCF10A fueron tratadas durante 20 min con VEs IGF-1 sin teñir, VEs Ctrl teñidas y VEs IGF-1 teñidas. Pasado el tiempo de incubación, la intensidad de fluorescencia de las células fue analizada mediante microscopia confocal. Las imágenes obtenidas revelaron que las células MCF10A tratadas con VEs Ctrl teñidas y VEs IGF-1 teñidas captan y retienen la señal fluorescente, la cual es superior comparada con la intensidad de fluorescencia de las células MCF10A tratadas con VEs IGF-1 sin teñir. Asimismo, el análisis de los valores de células tratadas con VEs Ctrl teñidas y VEs IGF-1 teñidas demostró que no hubo diferencia significativa entre ambos tratamientos (Fig. 13). Estos resultados nos indican que las células MCF10A pueden internalizar tanto VEs Ctrl como VEs IGF-1.

Por último, para determinar el papel de Akt1/2 y ERK1/2 en la captura de VEs IGF-1. Las células MCF10A fueron pretratadas con A6730 o con el inhibidor de ERK1/2, consecutivamente fueron incubadas con VEs IGF-1 teñidas y analizadas por microscopia confocal. Los resultados mostraron que la inhibición de Akt1/2 y de ERK1/2 no afectó la captura de las VEs IGF-1 en las células MCF10A (Fig. 13).



**Figura 13.** Las células MCF10A capturan VEs de células MDA-MB-231 sin estímulo y estimuladas con IGF-1. Análisis de la captura de VEs Ctrl y VEs IGF-1 por medio de microscopia confocal. Las células MCF10A fueron tratadas durante 20 min con VEs IGF-1 sin teñir, VEs Ctrl teñidas y VEs IGF-1 teñidas. Adicionalmente, las células MCF10A fueron pretratadas durante 1 h con 2  $\mu$ M de A6730 o con 50 nM del inhibidor ERK1/2, e incubadas durante 20 min con VEs IGF-1 teñidas. Los núcleos se tiñeron con el colorante Hoechst. Barra de escala = 40  $\mu$ m. Los gráficos representan las medias de las intensidades de fluorescencia  $\pm$  DE e indican el número de veces de incremento de la intensidad de fluorescencia con respecto a la intensidad de fluorescencia de las VEs Ctrl. ns no significativo.

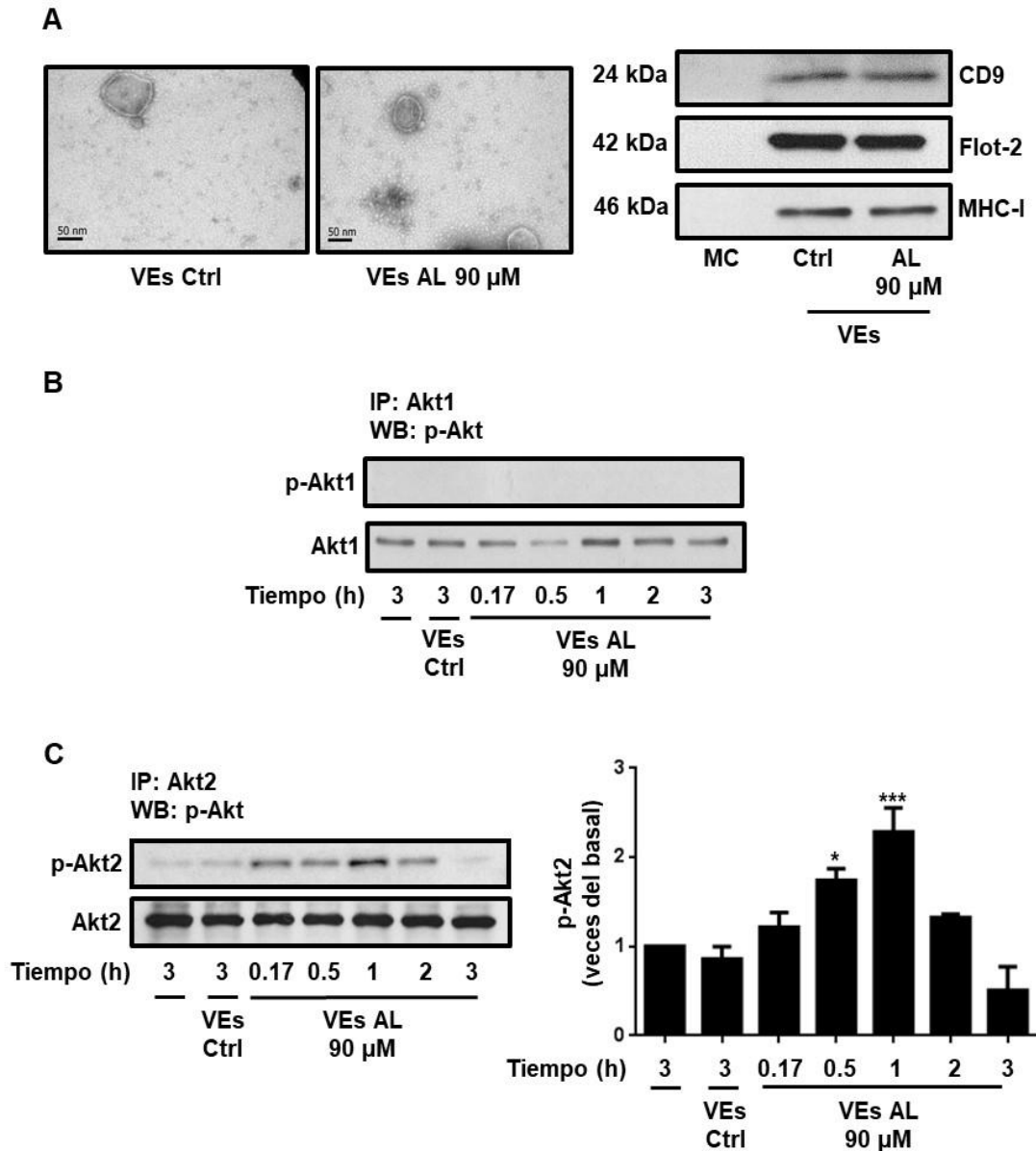
## **II. Resultados de VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL**

Las VEs secretadas por las células cancerosas inducen procesos que participan en la progresión tumoral a través de la activación aberrante de diferentes cascadas de señalización. En el presente estudio investigamos el mecanismo de señalización por el cual las VEs secretadas por células MDA-MB-231 estimuladas con AL median la migración y la invasión de las células MCF10A.

### **VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen la activación de Akt2**

En primer lugar, aislamos mediante centrifugación diferencial VEs de células MDA-MB-231 sin tratamiento (VEs Ctrl) y VEs de células MDA-MB-231 estimuladas durante 48 h con 90  $\mu$ M de AL (VEs AL 90  $\mu$ M). Para corroborar que las fracciones obtenidas estaban enriquecidas con VEs, éstas fueron analizadas mediante MET y WB usando los anticuerpos anti-CD9, anti-Flot-2 y anti-MHC-I. Como se muestra en la Fig. 14A, las fracciones de VEs mostraron una población homogénea de vesículas esféricas con tamaños entre 30-300 nm, y expresaron las proteínas marcadoras de VEs CD9, Flotilina-2 y MHC-I.

Posteriormente, se estudió si las VEs AL inducen la activación de Akt1 y Akt2. Con este fin, las células MCF10A fueron tratadas durante distintos tiempos con VEs Ctrl o VEs AL y se lisaron. Los lisados celulares fueron IP con el anticuerpo anti-Akt1 o anti-Akt2 y se analizaron mediante WB con el anticuerpo anti-p-Akt, que reconoce la fosforilación en la Ser-473 y Ser-474 de Akt1 y Akt2 respectivamente. Nuestros resultados demostraron que el tratamiento de células MCF10A con VEs AL no indujo un aumento en la fosforilación de Akt1 (p-Akt1), en cambio indujo un incremento en la fosforilación de Akt2 (p-Akt2), alcanzando un pico máximo de activación en 1 h de tratamiento (Fig. 14B y C).



**Figura 14. VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen la activación de Akt2 en células MCF10A.** (A) Caracterización de VEs derivadas de células MDA-MB-231 no estimuladas (VEs Ctrl) y VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas durante 48 h con AL 90  $\mu$ M (VEs AL 90  $\mu$ M) mediante MET y WB utilizando los anticuerpos anti-CD9, anti-Flotilina-2 (Flot-2) y anti-MHC-I. (B y C) Los lisados de células MCF10A estimuladas durante distintos tiempos con VEs Ctrl o VEs AL 90  $\mu$ M fueron analizados mediante IP con el anticuerpo anti-Akt1 o anti-Akt2. Posteriormente, los inmunoprecipitados se analizaron por medio de WB con el anticuerpo anti-p-Akt. Las membranas se examinaron con el anticuerpo anti-Akt1 o anti-Akt2 Ab como controles de carga. Se incluyó un control de células MCF10A no tratadas. Los gráficos representan la media  $\pm$  DE e indican el incremento de p-Akt2 por encima del valor de VEs Ctrl. Los asteriscos indican comparaciones realizadas con VEs Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

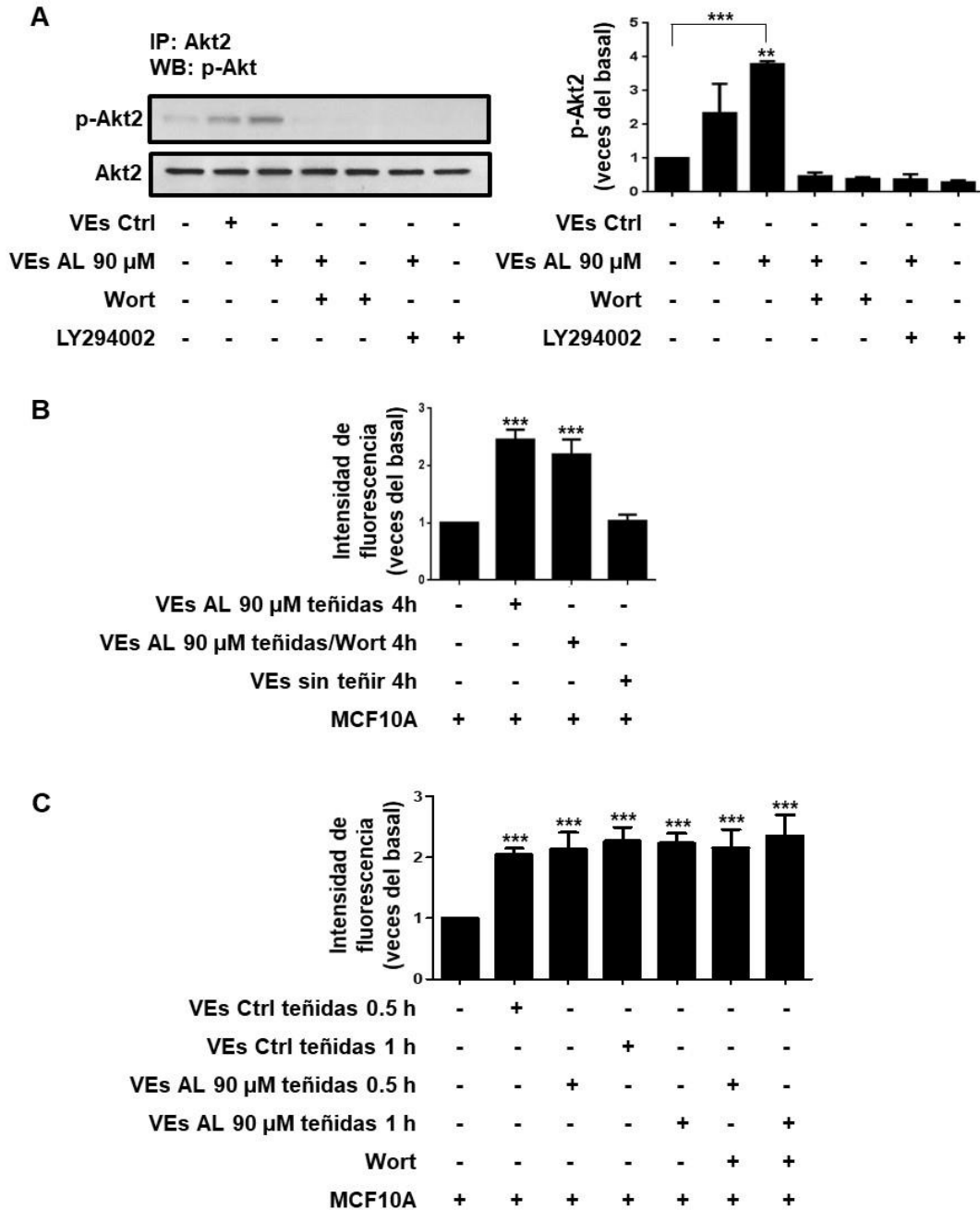


## **La actividad de PI3K es requerida para la activación de Akt2 inducida por las VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL**

Akt es el mediador primario río abajo de la señalización de PI3K, por lo que se analizó si la activación de Akt2 inducida por las VEs AL requiere de la actividad de PI3K. Con este propósito, las células MCF10A fueron pretratadas durante 2 h con 60 nM de wortmanina o con 10  $\mu$ M de LY294002, los cuales son inhibidores específicos de la actividad de PI3K, consecutivamente, se estimularon durante 1h con VEs Ctrl y VEs AL. Concluido el tiempo de estímulo, se obtuvieron los lisados celulares y se IP con el anticuerpo anti-Akt2, después se analizaron mediante WB con el anticuerpo anti-p-Akt. Los resultados demostraron que la activación de Akt2 mediada por las VEs AL requiere de la actividad de PI3K (Fig. 15A).

A continuación, se analizó si las células MCF10A capturan las VEs AL y también se evaluó el papel de PI3K en la captura. Para este fin, las VEs AL fueron teñidas con el colorante fluorescente CellMask™ Orange y las células MCF10A fueron pretratadas durante 2 h con o sin 60 nM de wortmanina, después del tratamiento con el inhibidor, las células se incubaron durante 4 h con las VEs AL teñidas. Finalmente, se analizó la intensidad de fluorescencia de las células MCF10A por medio de citometría de flujo. Los resultados mostraron que las VEs AL fueron capturadas por células MCF10A, mientras que el tratamiento con wortmanina no inhibió la captura de VEs AL. Esto indica que la vía de PI3K no interviene en la captura de las VEs AL por las células MCF10A (Fig. 15B).

Para corroborar que las VEs AL son capturadas por las células MCF10A a diferentes tiempos, realizamos ensayos de captura utilizando células MCF10A pretratadas con o sin wortmanina e incubadas durante 0.5 y 1 h con VEs Ctrl y VEs AL teñidas. El análisis por citometría de flujo mostró que las VEs Ctrl y las VEs AL son capturadas por las células MCF10A a las 0.5 y 1 h de tratamiento, y una vez más demostramos que el tratamiento con wortmanina no inhibe la captura de las VEs AL (Fig. 15C).



**Figura 15. Papel de PI3K en la activación de Akt2 inducida por VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL.** (A) Los lisados de células MCF10A pretratados con wortmanina (Wort) o LY294002 y estimulados durante 1 h con VEs Ctrl y VEs AL fueron inmunoprecipitados (IP) con el anticuerpo anti-Akt2 y analizados mediante WB con anti-p- Akt. Las membranas se analizaron con anti-Akt2 como control de carga. Se incluyó un control de células MCF10A sin tratamiento. (B) Análisis por citometría de flujo de células MCF10A pretratadas con o sin Wort e incubadas durante 4 h con VEs AL sin teñir o VEs AL teñidas. (C) Análisis por citometría de flujo de células MCF10A pretratadas con o sin Wort e incubadas durante 0.5 y 1 h con VEs Ctrl

teñidas o VEs AL teñidas. Los gráficos representan la media  $\pm$  DE y expresan el número de veces de incremento de p-Akt2 o de la intensidad media de fluorescencia con respecto a las VEs Ctrl o las VEs AL sin teñir. Los asteriscos indican comparaciones realizadas a las VEs Ctrl y al control (células sin tratamiento). **\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .**

### **Participación de la vía PI3K/Akt1/2 en la migración inducida por VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL**

Un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, indicó que las VEs AL inducen migración de células MCF10A (Galindo-Hernandez et al., 2014). De manera que, evaluamos la participación de PI3K y Akt en la migración. Primero, las células MCF10A fueron pretratadas con dos inhibidores específicos de PI3K (60 nM de wortmanina y 10  $\mu$ M de LY294002) y con un inhibidor específico de Akt1/2 (2  $\mu$ M de A6730) durante 1 h. Posteriormente, para evaluar la migración celular, se realizaron ensayos de cierre de herida estimulando células MCF10A durante 48 h con VEs Ctrl y VEs AL. Los resultados obtenidos mostraron que las VEs AL indujeron la migración de las células MCF10A a través de una vía dependiente de PI3K/Akt1/2 (Fig. 16A y B).

Para sustentar nuestros resultados, realizamos ensayos de migración utilizando cámaras de Boyden. Las células MCF10A fueron pretratadas con wortmanina y A6730, posteriormente se estimularon con VEs Ctrl y VEs AL. Los resultados obtenidos confirmaron que la migración de las células MCF10A inducida por las VEs AL requiere de la actividad de PI3K y Akt1/2 (Fig. 16C).

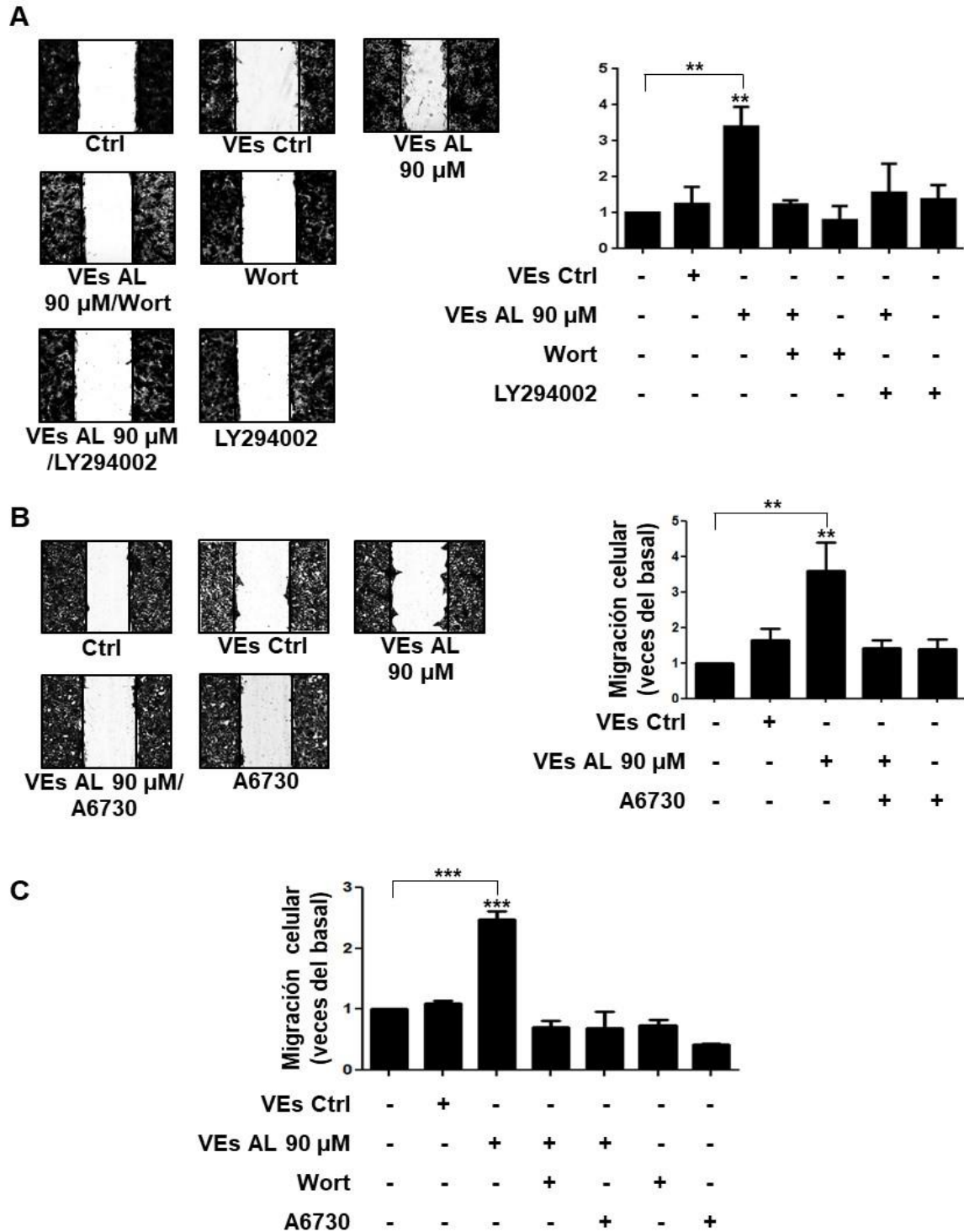
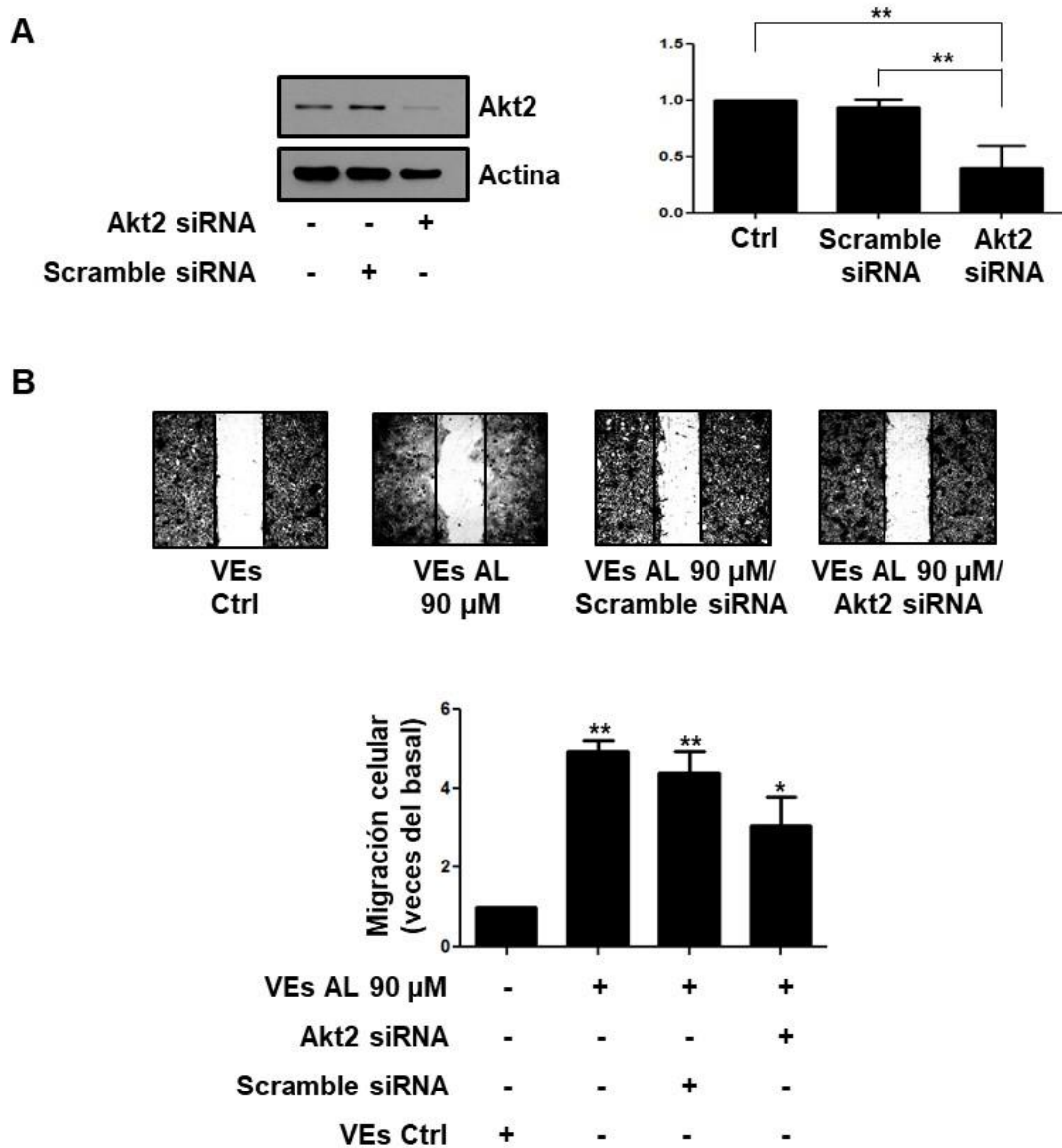


Figura 16. Las VEs derivadas células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración de células MCF10A a través de la vía PI3K/Akt1/2. (A y B) Ensayos de migración de cierre de herida realizados en células MCF10A pretratadas con Wort, LY294002 o A6730 y estimuladas con

VEs Ctrl y VEs AL. (C). Ensayos de migración en cámaras de Boyden. Las células MCF10A fueron pretratadas con Wort o LY294002 y estimuladas con VEs Ctrl y VEs AL. Se incluyó un control de células MCF10A sin tratamiento (Ctrl). Los gráficos representan la media  $\pm$  DE e indican las veces de incremento de la migración con respecto a las VEs Ctrl. Los asteriscos indican comparaciones realizadas con las VEs Ctrl y el Ctrl.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ .

### **Papel de Akt2 en la migración inducida por VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL**

La migración, la invasión y la TEM son procesos regulados principalmente por Akt2 en las células epiteliales y cancerosas mamarias (Irie et al., 2005; Chin y Toker, 2009). Por esta razón, se estudió el papel de Akt2 en la migración de las células MCF10A inducida por VEs AL. En primer lugar, se silenció la expresión de Akt2 en las células MCF10A mediante un ARN de interferencia (*siRNA*) contra Akt2. La eficiencia del silenciamiento de Akt2 fue analizada por WB (Fig. 17A). A continuación, se realizaron ensayos de cierre de herida en esas células MCF10A y por último se estimularon con VEs Ctrl y VEs AL. Los resultados mostraron que la migración inducida por las VEs AL dependió parcialmente de la expresión de Akt2 en las células MCF10A (Fig. 17B).



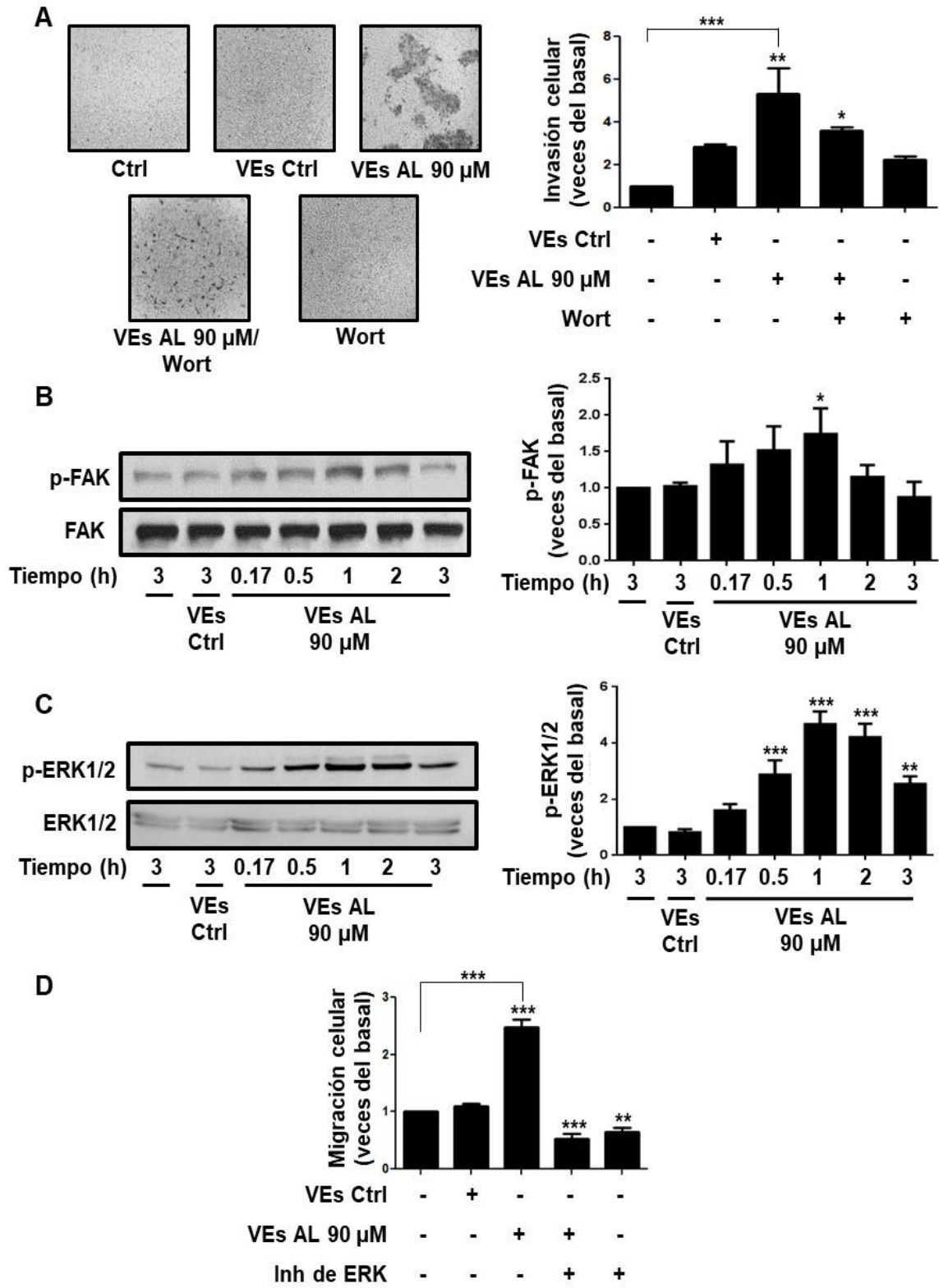
**Figura 17. Participación de Akt2 en la migración de las células MCF10A inducida por VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL.** (A) Las células MCF10A fueron transfectadas utilizando un siRNA específico para Akt2 o con un siRNA inespecífico (scramble). Enseguida, las células transfectadas fueron lisadas y el silenciamiento de Akt2 se analizó mediante WB utilizando el anticuerpo anti-Akt2. Se incluyó un control de actina. La gráfica representa la media  $\pm$  DE y expresa el número de veces de disminución de Akt2 con respecto al Ctrl y al scramble. (B) Ensayos de migración realizados con células MCF10A transfectadas con el siRNA para Akt2 o con el siRNA inespecífico y tratadas con VEs Ctrl o con VEs AL. La gráfica representa la media  $\pm$  DE e indica el número de veces de la migración celular con respecto a las VEs Ctrl. Los asteriscos representan las comparaciones realizadas a las células sin estímulo (Ctrl), al scramble y a las VEs Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

## **VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen invasión a través de una vía dependiente de PI3K, activación de FAK y ERK1/2**

Previamente reportamos que las VEs AL promueven invasión de células MCF10A (Galindo-Hernandez et al. 2014), por consiguiente, se examinó el papel de PI3K en el proceso de invasión. Con este propósito, se realizaron ensayos de invasión en cámaras de Boyden recubiertos con matrigel con células MCF10A pretratadas durante 2 h con 60 nM de wortmanina y estimuladas durante 72 h con VEs AL. En la Fig. 18A se muestra que el tratamiento con wortmanina inhibió la invasión inducida por las VEs AL en las células MCF10A.

FAK y ERK1/2 son proteínas fundamentales durante la progresión tumoral en los procesos de migración e invasión (Di et al. 2015; Zhao y Guan 2011). Para evaluar si las VEs AL promueven la activación de FAK y ERK1/2, la cual esta mediada por la fosforilación en los residuos de Tyr397 y Thr-202/Tyr-204, respectivamente. Cultivos de células MCF10A se trataron durante diferentes periodos de tiempos con VEs AL. Posteriormente, las células fueron lisadas y analizadas mediante WB utilizando los anticuerpos anti-p-FAK y anti-p-ERK1/2. Los resultados obtenidos mostraron que las VEs AL inducen la fosforilación de FAK en 1 h de tratamiento, al igual que de ERK1/2 a las 0.5, 1 y 2 h de tratamiento. El pico máximo de activación de ambas proteínas fue en 1 h de tratamiento (Fig. 18B y C).

Finalmente, se analizó la participación de ERK1/2 en la migración de células MCF10A inducida por las VEs AL. Con esta finalidad, se realizaron ensayos de migración en cámaras de Boyden. Las células MCF10A fueron pretratadas durante 1 h con 100  $\mu$ M de un inhibidor específico de ERK y posteriormente estimuladas con VEs AL. Los resultados indicaron que las VEs AL inducen migración de células MCF10A a través de una vía dependiente de ERK1/2 (Fig. 18D).





**Figura 18. VEs de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen invasión de células MCF10A a través de una vía dependiente de PI3K y activación de las proteínas FAK y ERK1/2.** (A) La invasión celular fue analizada utilizando cámaras de Boyden recubiertas con matrigel. Las células MCF10A fueron pretratadas con o sin 60 nM de Wort y estimuladas con VEs Ctrl o con VEs AL. (B y C) Los lisados de células MCF10A estimuladas durante diferentes tiempos con VEs Ctrl y VEs AL se analizaron mediante WB utilizando los anticuerpos anti-p-FAK o anti-p-ERK1/2. Adicionalmente, las membranas fueron examinadas con los anticuerpos anti-FAK y anti-ERK1/2 como controles de carga. Se incluyó un control de células sin tratamiento (Ctrl). (D) Ensayos de migración realizados en cámaras de Boyden. Las células MCF10A fueron pretratadas con o sin un inhibidor de ERK, a continuación, se estimularon con VEs Ctrl y VEs AL. Los gráficos representan la media  $\pm$  DE y expresan las veces del incremento de la invasión, de p-FAK, de p-ERK1/2 o de la migración con respecto a las VEs Ctrl. Los asteriscos indican comparaciones realizadas con el Ctrl y VEs Ctrl. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## DISCUSIÓN

### I. VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen un proceso de TEM

El sistema IGF contribuye en la progresión y desarrollo del cáncer de mama a través de distintos mecanismos como la sobreexpresión de IGF-1 e IGF-2, cambios en la expresión de los receptores de IGF y reducción de los niveles de IGFBP circulantes (Farabaugh et al., 2015, Motallebnezhad et al., 2016). Además, IGF-1R se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama, esta sobreexpresión se ha relacionado con un fenotipo agresivo, un resultado clínico pobre y resistencia a la terapia (Papa et al., 1993, Jones et al., 2007, Christopoulos et al., 2015). Aunque el papel de IGF-1 ha sido estudiado en distintos procesos relacionados a la progresión tumoral mamaria, el papel de IGF-1 en la secreción y función de las VEs derivadas de células tumorales mamarias aún no ha sido descrito. Por lo que en este estudio evaluamos si las VEs de células tumorales mamarias MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen TEM de células epiteliales mamarias MCF10A.

Las VEs son pequeñas partículas compuestas de una doble de membrana, cuyos tamaños oscilan entre 30 a 1000 nm de diámetro, las cuales contribuyen a la progresión tumoral y a la metástasis a través de la transferencia de proteínas, lípidos y algunos tipos de ARN (Greening et al., 2015). En el presente trabajo, demostramos mediante MET y WB que las células MDA-MB-231 sin tratamiento y aquellas tratadas con IGF-1 secretan una población heterogénea de VEs con tamaños entre 50 y 500 nm, además expresan marcadores asociados a exosomas y microvesículas. Sin embargo, hipotetizamos que las VEs Ctrl y VEs IGF-1 contienen diferentes cargos moleculares y que únicamente las VEs IGF-1 son capaces de inducir procesos involucrados en el programa de TEM en células MCF10A.

El proceso de TEM es el paso más importante para el desarrollo de la metástasis, debido a que las células tumorales epiteliales adquieren la capacidad de migrar e invadir tejidos circundantes y alcanzar vasos sanguíneos y linfáticos, con intravasación a los mismos (Thiery et al., 2009). En este trabajo, se demostró que las VEs IGF-1 inducen la migración de células MCF10A, pero no inducen la migración de células MDA-MB-231. En cambio, el tratamiento únicamente con IGF-1 promueve migración de las células MDA-MB-231. Estos resultados indican que las VEs IGF-1 no son capaces de mediar la migración a través de un mecanismo autocrino y/o paracrino en las células MDA-MB-231. En línea con esta idea, proponemos que el estímulo con IGF-1 en las células MDA-MB-231 regula un cambio en la selección de los cargos de las VEs en comparación con las VEs secretadas de células MDA-MB-231 sin estímulo, por lo que las VEs IGF-1 pueden inducir la activación de cascadas de señalización involucradas en mediar migración de las células MCF10A. En contraste, los cargos contenidos en las VEs IGF-1 no son capaces de activar las vías de señalización involucradas en regular la migración de células MDA-MB-231. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que puedan promover otros procesos como proliferación y/o sobrevivencia celular. En línea con esta propuesta, se demostró que el tratamiento de células MDA-MB-231 con AL promueve la secreción de VEs, las cuales regulan una comunicación autocrina/paracrina para inducir la migración y la invasión de células MDA-MB-231 (Ramirez-Ricardo et al., 2021).

Las cadherinas son un tipo de moléculas de adhesión celular, cuya función es fundamental en la regulación de las uniones intercelulares. Sin embargo, la expresión anormal de cadherinas está asociada con la progresión tumoral (Gavert and Ben-Ze'ev, 2008, Wang et al., 2019). Específicamente, durante el proceso de TEM, las células epiteliales adquieren propiedades migratorias e invasivas a través de la pérdida de las uniones intercelulares. En particular, las uniones adherentes comienzan a desensamblarse lo que implica la pérdida o disminución de la expresión de E-cadherina y la reorganización del citoesqueleto de actina con la formación de fibras de estrés y el ensamble de adhesiones focales (Gumbiner, 2005, Lee et al., 2006). La desregulación de la expresión de E-cadherina está

mediada por diversos factores de transcripción incluidos Snail1, Snail2, ZEB2, E4 y Sip1, los cuales se unen directamente al promotor del gen de E-cadherina en las secuencias específicas denominadas cajas E, regulando negativamente su transcripción (Cano et al., 2000, Baranwal and Alahari, 2009). En el presente trabajo, demostramos que las VEs IGF-1 disminuyen los niveles de ARNm de E-cadherina a las 9 h de tratamiento, del mismo modo, reducen transitoriamente la expresión de la proteína E-cadherina en las células MCF10A. Además, el tratamiento con VEs IGF-1 induce un incremento de los represores transcripcionales de E-cadherina, Snail1, Twist1 y Sip1, en las células MCF10A. Estos resultados apoyan la propuesta de que el tratamiento con IGF-1 en las células MDA-MB-231 promueve un cambio en los cargos de las VEs los cuales son transportados y transferidos a las células MCF10A para mediar la disminución de la expresión de E-cadherina. De acuerdo con nuestra propuesta, un estudio reciente reveló que la activación de PAR2 en células MDA-MB-231 induce la liberación de VEs las cuales son capaces de incrementar la expresión de Snail y Slug, asimismo, disminuyen la expresión de E-cadherina a través de la transferencia del microARN221 en las células MCF-7 (Das et al., 2019).

La activación del proceso de TEM se propuso como un mecanismo importante para que las células tumorales epiteliales adquieran un fenotipo mesenquimal a través de la ganancia de marcadores mesenquimales incluyendo N-cadherina, fibronectina,  $\alpha$ -SMA y vimentina (Saitoh, 2018). Concretamente, N-cadherina está involucrada en el desprendimiento de las células tumorales, la migración, y la invasión celular; mientras que vimentina, una proteína de filamentos intermedios, se ha relacionado con la migración de células epiteliales y la invasión (Thiery, 2003, Hult et al., 2007, Gavert and Ben-Ze'ev, 2008). En este estudio se demostró que las VEs IGF-1 inducen un incremento transitorio de la expresión de N-cadherina y vimentina en las células MCF10A. Además, el incremento de la expresión de vimentina se observó particularmente en las células migratorias localizadas en el frente de la migración. Por lo tanto, estos resultados indican que las VEs IGF-1 inducen un proceso de TEM en las células MCF10A, lo que sugiere

que el papel de las VEs IGF-1 es fundamental en la migración, en la invasión y en la metástasis de células tumorales mamarias.

Una de las principales características que adquieren las células tumorales durante la TEM, es la capacidad de invadir la matriz extracelular mediante la secreción de MMPs (Gavert and Ben-Ze'ev, 2008, Lu and Kang, 2019). Estudios previos reportaron que las VEs derivadas de células cancerosas promueven TEM, migración e invasión debido a que contienen proteínas como MET, ADAM10, MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP (Garnier et al., 2013, He et al., 2015, Greening et al., 2015, Dolo et al., 1999). Nuestros resultados revelaron que las VEs IGF-1 promueven un aumento de la secreción de la MMP-9 y la invasión de las células MCF10A. Interesantemente, las VEs Ctrl inducen la secreción de la MMP-9, pero no inducen la invasión de las células MCF10A. Por lo tanto, proponemos que las VEs Ctrl contienen algunas proteínas que inducen la secreción de la MMP-9, sin embargo, no contienen todos los cargos requeridos para inducir TEM. Nuestros resultados apoyan la propuesta que las VEs IGF-1 inducen un proceso de TEM en las células MCF10A y que desempeñan un papel importante en la invasión y en la metástasis del cáncer de mama. De manera similar, las VEs derivadas de células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 inducen la secreción de MMP-9, TGF- $\beta$  e IL-6 en células monocíticas THP-1 (Redzic et al., 2013). En otro estudio se reportó que los exosomas derivados de células de carcinoma hepatocelular incrementan la secreción de MMP-2 y MMP-9 facilitando la migración y la invasión (He et al., 2015). En función con lo propuesto, las VEs de pacientes con cáncer de mama y las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL promueven un incremento de la secreción de la MMP-9 y MMP-2 induciendo la TEM de las células MCF10A, así como migración e invasión de las células MDA-MB-231 (Galindo-Hernandez et al., 2014, Galindo-Hernandez et al., 2015, Ramirez-Ricardo et al., 2021). En conjunto, estos estudios apoyan la propuesta de que los ligandos utilizados para la estimulación de las células de cáncer de mama inducen la liberación de VEs con una variedad de cargos que median respuestas celulares específicas en sus células receptoras.

La migración celular es un componente clave en el proceso de TEM (Gavert and Ben-Ze'ev, 2008). La vía de señalización de ERK1/2 regula diversos procesos celulares como la proliferación, la diferenciación e incluyendo la migración. Sin embargo, la hiperactivación de ERK1/2 está implicada en la inflamación, en el trastorno del desarrollo y en la progresión del cáncer (Guo et al., 2020). En este estudio demostramos que las VEs IGF-1 inducen la activación de ERK1/2 y que la migración de células MCF10A inducida por las VEs IGF-1 es dependiente de la actividad de ERK1/2. Nuestros resultados indican que las VEs IGF-1 regulan un proceso de TEM a través de la activación de ERK1/2 en las células MCF10A. De forma similar, exosomas secretados por células MHCC97H de carcinoma hepatocelular altamente metastásico indujeron un proceso de TEM a través de la activación de ERK1/2 en células HLE de carcinoma hepatocelular de baja agresividad (Chen et al., 2018). Nuestros resultados sugieren fuertemente que las VEs IGF-1 juegan un papel importante en la invasión tumoral y en la metástasis del cáncer de mama mediante la inducción del proceso de TEM mediado por la activación de la cinasa ERK1/2.

Estudios realizados en modelos de ratón y en cultivos celulares revelaron que Akt1 participa en la iniciación del tumor, además su activación está relacionada con propiedades anti-migratorias y anti-metastásicas independiente del subtipo de cáncer de mama. Contrariamente, la activación de Akt2 está relacionada en promover migración, invasión y metástasis (Irie et al., 2005, Dillon et al., 2009, Li et al., 2018). En este trabajo encontramos que las VEs IGF-1 inducen la activación de Akt1 y Akt2 en las células MCF10A. Sin embargo, desconocemos si la migración inducida por las VEs IGF-1 es mediada por actividad de Akt1 y/o Akt2, debido a que el inhibidor que utilizamos está dirigido contra ambas isoformas. Interesantemente, las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL no inducen activación de Akt1, pero si promueven la activación de Akt2, además la migración de células MCF10A inducida por las VEs es a través de la actividad de Akt2 (Leal-Orta et al., 2019). En contraste, exosomas derivados de células MHCC97H de carcinoma hepatocelular altamente metastásico inducen migración, pero no promueven la activación de Akt1/2 en células HLE de carcinoma

hepatocelular con baja agresividad (Chen et al., 2018). En suma, estos resultados soportan la propuesta que la activación de vías específicas de señalización en las células receptoras depende del cargo de las VEs, los cuales a su vez dependen del contexto bioquímico del tumor, dígame hipoxia, acidez, presencia o ausencia de ligandos en el ambiente tumoral. Dicho de otro modo, el contexto bioquímico determina el cargo en las VEs, y dichos cargos determinan la activación de vías específicas de señalización que modulan procesos específicos en las células blanco.

Estudios previos demostraron que la señalización inducida por el IGF-1 involucra la activación de las vías PI3K/Akt y MAPK promoviendo migración, invasión y TEM, asimismo promueve la expresión y activación de proteínas involucradas en la progresión tumoral, incluyendo TGF- $\beta$ , MMPs, GSK-3 $\beta$ , survivina y  $\beta$ -catenina (Walsh and Damjanovski, 2011, Li et al., 2015, Liu et al., 2018, Wen et al., 2017). De acuerdo a lo anterior, proponemos que las VEs IGF-1 contienen algunas de esas moléculas y podría ser un mecanismo por el cual las VEs inducen la TEM en las células MCF10A. Asimismo, la vía de PI3K/Akt podría estar involucrada en el cambio de cargo de las VEs en las células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1. En línea con esta propuesta, un estudio reportó que la activación de la vía PI3K/Akt, mediada por insulina, induce el cambio de cargo proteico en las VEs, enriqueciendo a estas con proteínas como p-Akt, FAT1 y P-cadherina; además sugiriendo, que el estado de fosforilación de una proteína puede influenciar en la selección de los cargos en las VEs (Liem et al., 2017).

La liberación y captura de VEs representan un mecanismo de comunicación celular entre las células cancerosas, las células circundantes y el estroma, a través del cual se regula la transferencia de cargos que activan diferentes respuestas y procesos celulares (van Niel et al., 2018). En el presente trabajo, demostramos que las células MCF10A pueden capturar tanto a las VEs Ctrl como las VEs IGF-1. Sin embargo, únicamente las VEs IGF-1 inducen un proceso de TEM a través de la activación de ERK1/2 y Akt1/2 en las células MCF10A. Además, demostramos que las vías de ERK1/2 y Akt1/2 no participan en la captura de VEs IGF-1. De acuerdo con nuestros resultados, un estudio previo

demostró que la inhibición de Akt en las células receptoras MCF-7, no interfiere con la fusión de las VEs secretadas por células MDA-MB-231 (Das et al., 2019). Proponemos que las células MCF10A internalizan a las VEs IGF-1 a través de un mecanismo independiente de la vía PI3K/Akt1/2. No obstante, queda por investigar las vías de señalización involucradas en la captura de las VEs en las células MCF10A.

En conjunto, estos resultados demuestran que el IGF-1 induce la secreción de VEs en células MDA-MB-231 y que estas VEs son reguladoras importantes de las cascadas de señalización oncogénicas, como PI3K/Akt y ERK1/2, las cuales regulan el programa de TEM en células MCF10A.

## **II. VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL inducen migración e invasión a través de la vía PI3K/Akt**

Los factores de riesgos para desarrollar cáncer de mama son múltiples, particularmente destacan los factores relacionados al estilo de vida, como una dieta rica en ácidos grasos, incluyendo ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -6 (Kim et al., 2006, Schulz et al., 2008). El principal ácido graso  $\omega$ -6 en la dieta occidental es el AL, el cual es consumido de 15-20 g por día por persona y se encuentra en concentraciones plasmáticas de aproximadamente 275  $\mu$ M (Anderson et al., 2009, Ferrucci et al., 2006). Destaca que en las células cancerosas mamarias MDA-MB-231, el estímulo con 90  $\mu$ M de AL induce migración e invasión (Serna-Marquez et al., 2017).

Las células tumorales comparten proteínas e información genética a través de la secreción y captura de VEs, las cuales pueden transferir moléculas bioactivas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, receptores de quimiocinas, receptores de factores de crecimiento, factores de transcripción funcionales y otras proteínas transmembranales (Ciardiello et al., 2016, Minciacchi et al., 2015). En un estudio previo de nuestro laboratorio se reportó que las VEs AL inducen un proceso de



TEM (Galindo-Hernandez et al., 2014). Sin embargo, se desconocen las vías de transducción de señales por las cuales las VEs AL inducen migración e invasión en células MCF10A. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación de la vía PI3K/Akt en estos procesos.

Se ha reportado que Akt1 y Akt2 desempeñan diferentes funciones durante la progresión del cáncer de mama mediante la regulación de proteínas específicas. Por ejemplo, Akt-1 induce proliferación celular a través de la regulación de la ciclina D1, mientras que Akt2 induce migración e invasión celular a través de la regulación de F-actina y vimentina (Riggio et al., 2017). Además, la expresión de Akt2 es mayor en las regiones de contactos célula-matriz y su localización preferencial en esas áreas puede permitir interacciones con moléculas requeridas para la motilidad y la invasión celular. La vía PI3K/Akt regula diversos procesos biológicos incluyendo sobrevivencia celular y desarrollo del tumor (Toker, 2012). Específicamente, PI3K media una variedad de procesos celulares tal como migración e invasión (Cantley, 2002, Vivanco and Sawyers, 2002). Dentro de este orden de ideas, los resultados del presente trabajo mostraron que las VEs AL inducen la activación de Akt2, lo cual requiere de la actividad de PI3K. Asimismo, demostramos que las VEs AL inducen migración e invasión de las células MCF10A a través de una vía dependiente de PI3K. En cambio, la actividad de PI3K no regula la captura de las VEs Ctrl ni de las VEs AL. Debido a que el tratamiento con VEs Ctrl no induce la migración ni la invasión de células MCF10A, proponemos que las VEs Ctrl no inducen la activación de PI3K y consecuentemente de Akt1/2.

Nuestros resultados también demostraron que las células MCF10A capturan cantidades similares de VEs AL y VEs Ctrl, no obstante, sólo las VEs AL inducen migración e invasión de las células MCF10A. Por lo tanto, proponemos que el tratamiento con AL en las células MDA-MB-231 induce un enriquecimiento de diversos cargos en las VEs, los cuales son capaces de mediar la migración y la invasión de las células MCF10A a través de una vía dependiente de PI3K. En función a lo planteado, un estudio reportó que los exosomas derivados de la línea celular SGC7901 de cáncer gástrico inducen la activación de Akt y un incremento

de la proliferación, el cual dependió de la actividad de PI3K, en las líneas celulares SGC7901 y BGC823 de cáncer gástrico (Qu et al., 2009).

En el presente trabajo demostramos el papel de la vía PI3K/Akt en la migración inducida por las VEs AL mediante el tratamiento con un inhibidor específico de PI3K y de Akt1/2, los cuales interrumpieron completamente la migración. Sin embargo, la inhibición de la expresión de Akt2 interrumpió parcialmente la migración de las células MCF10A. De acuerdo con lo anterior, proponemos que las VEs inducen migración a través de una vía dependiente de Akt2, pero la inhibición de la expresión de Akt2 promueve que Akt1 regule parcialmente la migración inducida por las VEs AL. En línea con nuestra propuesta, se demostró que los exosomas derivados de líneas celulares de carcinoma hepatocelular promueven la migración y la activación de Akt1/2 de una línea celular de hepatocitos inmortalizados (He et al., 2015).

Durante el proceso de TEM, las células epiteliales adquieren la capacidad de migrar e invadir la matriz extracelular a través de la activación de receptores de superficie celular y de cinasas incluyendo FAK y ERK1/2 (Avizienyte and Frame, 2005). Particularmente, FAK está asociado con el desarrollo del tumor y la metástasis, debido a que regula sobrevivencia, migración, invasión, angiogénesis y el proceso de TEM (Zhao and Guan, 2011). La actividad de las cinasas ERK1/2 está incrementada en diversos cánceres regulando procesos como la proliferación y la migración celular (Huang et al., 2004). Nuestros resultados demostraron que las VEs AL inducen la activación de FAK y ERK1/2, y que la migración depende de la actividad de ERK1/2 en las células MCF10A. Similar a nuestros resultados, las células troncales embrionarias secretan microvesículas que promueven migración y la activación de FAK y JNK en el trofoblasto durante el proceso de implantación (Desrochers et al., 2016). Además, los exosomas derivados de las células SW480 de cáncer colorrectal inducen la activación de ERK1/2 y la migración de células HepG2 de cáncer hepatocelular, mientras que las VEs derivadas de las células de cáncer colorrectal inducen migración a través de la activación de ERK1/2 y JNK en células endoteliales (Chiba et al., 2016, Yoon et al., 2014).

En conjunto, estos resultados permiten concluir que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con AL, induce la secreción de VEs con la composición molecular capaz de inducir la activación de Akt2, así como la migración y la invasión de las células MCF10A a través de una vía dependiente de PI3K/Akt, y dado que la migración y la invasión son los procesos biológicos que median la TEM, nuestros resultados también muestran que este proceso es mediado por la activación de la vía PI3K/Akt. Apoyando nuestra propuesta, se reportó que las alteraciones en las condiciones de cultivo modifican la composición molecular de las VEs derivadas de células tumorales y de células endoteliales. Del mismo modo, la radiación altera la composición de las VEs secretadas por células tumorales escamosas de cabeza y cuello, las cuales inducen migración de las células receptoras (Colombo et al., 2014, Mutschelknaus et al., 2017).

## **CONCLUSIONES**

### **I. Participación de VEs IGF-1 en células MCF10A**

El presente trabajo indica que el IGF-1 promueve la liberación de VEs que son capaces de inducir un proceso de TEM en las células MCF10A. Específicamente, las VEs IGF-1 disminuyen transitoriamente la expresión de E-cadherina, e incrementan la expresión de N-cadherina, vimentina y la secreción de MMP-9. Además, incrementan la expresión de Snail1, Twist1 y Sip1 y promueven la activación de ERK1/2, Akt1/2, migración e invasión (Fig. 19). Estos resultados sugieren fuertemente que IGF-1 juega un papel importante en la invasión y metástasis del cáncer de mama a través de la secreción de VEs, la cuales pueden transportar moléculas relevantes para alterar la función de sus células receptoras contribuyendo así en la progresión de la enfermedad. Nuestros resultados también demuestran que debe ponerse atención especial a los niveles de IGF-1 en las mujeres con cáncer de mama, así como a las VEs en los diferentes estadios de la enfermedad, en particular en los estadios previos a la metástasis.

### **II. Participación de VEs AL en las células MCF10A**

En conclusión, este estudio demostró que las VEs AL inducen migración a través de una vía dependiente de PI3K/Akt y de ERK1/2 en las células MCF10A. Además, las VEs AL también promueven la activación de FAK y ERK1/2 y la invasión a través de una vía dependiente de PI3K. Por lo tanto, proponemos que el AL regula la secreción de VEs para amplificar la señal en el microambiente tumoral contribuyendo a la patogénesis del cáncer de mama.

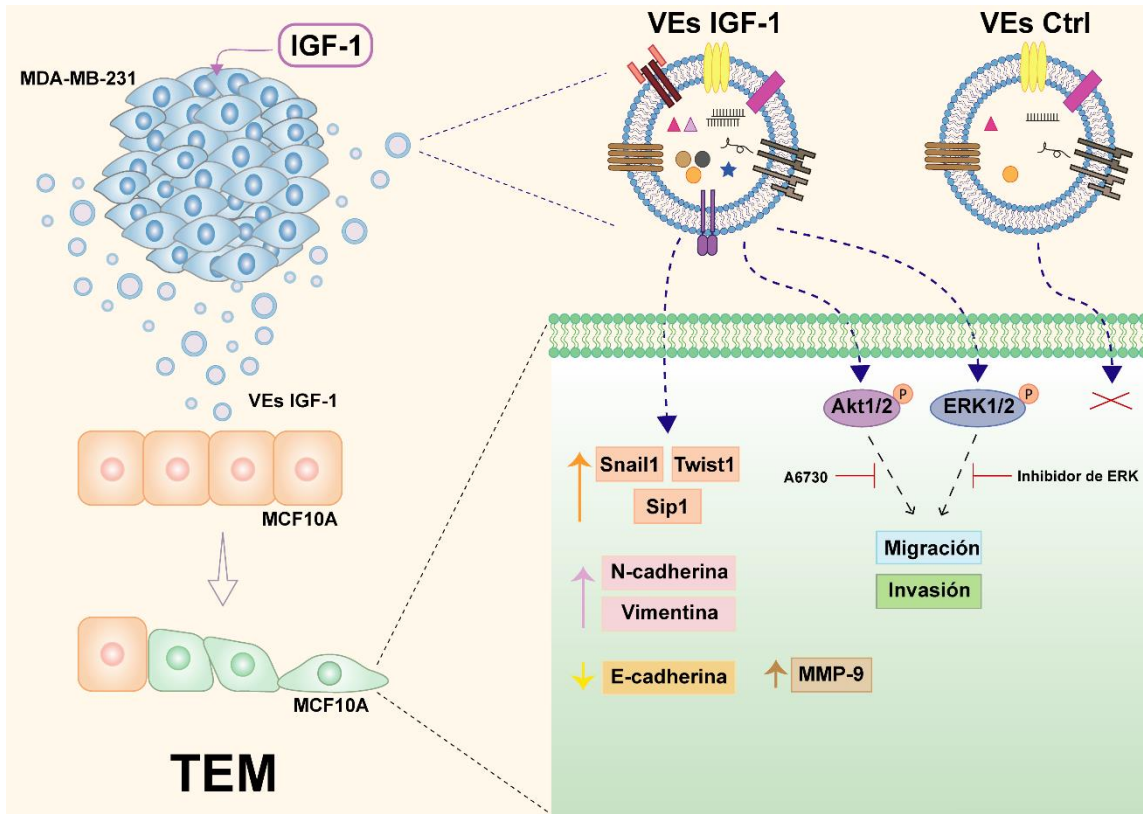


Figura 19. Modelo esquemático propuesto por el cual las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con IGF-1 inducen un proceso de TEM en las células MCF10A.

## REFERENCIAS

- AL-NEDAWI, K., MEEHAN, B., MICALLEF, J., LHOTAK, V., MAY, L., GUHA, A. & RAK, J. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10, 619-24.
- ALI, S. & COOMBES, R. C. 2002. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*, 2, 101-12.
- ANDERSON, S. G., SANDERS, T. A. & CRUICKSHANK, J. K. 2009. Plasma fatty acid composition as a predictor of arterial stiffness and mortality. *Hypertension*, 53, 839-45.
- AVIZIENYTE, E. & FRAME, M. C. 2005. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 542-7.
- BACH, L. A. 2015. Endothelial cells and the IGF system. *J Mol Endocrinol*, 54, R1-13.
- BARAN, J., BAJ-KRZYWORZEKA, M., WEGLARCZYK, K., SZATANEK, R., ZEMBALA, M., BARBASZ, J., CZUPRYNA, A., SZCZEPANIK, A. & ZEMBALA, M. 2010. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 59, 841-50.
- BARANWAL, S. & ALAHARI, S. K. 2009. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 384, 6-11.
- BARNARD, M. E., BOEKE, C. E. & TAMIMI, R. M. 2015. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta*, 1856, 73-85.
- BURGER, G. A., DANEN, E. H. J. & BELTMAN, J. B. 2017. Deciphering Epithelial-Mesenchymal Transition Regulatory Networks in Cancer through Computational Approaches. *Front Oncol*, 7, 162.
- BYON, C. H., HARDY, R. W., REN, C., PONNAZHAGAN, S., WELCH, D. R., MCDONALD, J. M. & CHEN, Y. 2009. Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4. *Lab Invest*, 89, 1221-8.
- CALLE, E. E. & KAKS, R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 4, 579-91.
- CAMUSSI, G., DEREGIBUS, M. C., BRUNO, S., CANTALUPPI, V. & BIANCONE, L. 2010. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*, 78, 838-48.
- CANO, A., PEREZ-MORENO, M. A., RODRIGO, I., LOCASCIO, A., BLANCO, M. J., DEL BARRIO, M. G., PORTILLO, F. & NIETO, M. A. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2, 76-83.
- CANTLEY, L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296, 1655-7.
- CHAVARRI-GUERRA, Y., VILLARREAL-GARZA, C., LIEDKE, P. E., KNAUL, F., MOHAR, A., FINKELSTEIN, D. M. & GOSS, P. E. 2012. Breast cancer in

- Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol*, 13, e335-43.
- CHEN, L., GUO, P., HE, Y., CHEN, Z., CHEN, L., LUO, Y., QI, L., LIU, Y., WU, Q., CUI, Y., FANG, F., ZHANG, X., SONG, T. & GUO, H. 2018. HCC-derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial-mesenchymal transition through MAPK/ERK signalling pathway. *Cell Death Dis*, 9, 513.
- CHIBA, M., WATANABE, N., WATANABE, M., SAKAMOTO, M., SATO, A., FUJISAKI, M., KUBOTA, S., MONZEN, S., MARUYAMA, A., NANASHIMA, N., KASHIWAKURA, I. & NAKAMURA, T. 2016. Exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells promote cell migration in HepG2 hepatocellular cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol*, 48, 305-12.
- CHIN, Y. R. & TOKER, A. 2009. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal*, 21, 470-6.
- CHRISTOPOULOS, P. F., MSAOUEL, P. & KOUTSILIERIS, M. 2015. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Mol Cancer*, 14, 43.
- CIARDIELLO, C., CAVALLINI, L., SPINELLI, C., YANG, J., REIS-SOBREIRO, M., DE CANDIA, P., MINCIACCHI, V. R. & DI VIZIO, D. 2016. Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *Int J Mol Sci*, 17, 175.
- COHEN, D. H. & LEROITH, D. 2012. Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocr Relat Cancer*, 19, F27-45.
- COLOMBO, M., RAPOSO, G. & THERY, C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.
- COUGHLIN, S. S. 2019. Epidemiology of Breast Cancer in Women. In: AHMAD, A. (ed.) *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress*. Cham: Springer International Publishing.
- COUGHLIN, S. S. & SMITH, S. A. 2015. The Insulin-like Growth Factor Axis, Adipokines, Physical Activity, and Obesity in Relation to Breast Cancer Incidence and Recurrence. *Cancer Clin Oncol*, 4, 24-31.
- D'ESPOSITO, V., PASSARETTI, F., HAMMARSTEDT, A., LIGUORO, D., TERRACCIANO, D., MOLEA, G., CANTA, L., MIELE, C., SMITH, U., BEGUINOT, F. & FORMISANO, P. 2012. Adipocyte-released insulin-like growth factor-1 is regulated by glucose and fatty acids and controls breast cancer cell growth in vitro. *Diabetologia*, 55, 2811-2822.
- DAS, K., PAUL, S., SINGH, A., GHOSH, A., ROY, A., ANSARI, S. A., PRASAD, R., MUKHERJEE, A. & SEN, P. 2019. Triple-negative breast cancer-derived microvesicles transfer microRNA221 to the recipient cells and thereby promote epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 294, 13681-13696.
- DESROCHERS, L. M., BORDELEAU, F., REINHART-KING, C. A., CERIONE, R. A. & ANTONYAK, M. A. 2016. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nat Commun*, 7, 11958.

- DILLON, R. L., MARCOTTE, R., HENNESSY, B. T., WOODGETT, J. R., MILLS, G. B. & MULLER, W. J. 2009. Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res*, 69, 5057-64.
- DOLO, V., D'ASCENZO, S., VIOLINI, S., POMPUCCI, L., FESTUCCIA, C., GINESTRA, A., VITTORELLI, M. L., CANEVARI, S. & PAVAN, A. 1999. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Exp Metastasis*, 17, 131-40.
- DONGRE, A. & WEINBERG, R. A. 2019. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 69-84.
- ESPINOSA-NEIRA, R., MEJIA-RANGEL, J., CORTES-REYNOSA, P. & SALAZAR, E. P. 2011. Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 1782-91.
- FARABAUGH, S. M., BOONE, D. N. & LEE, A. V. 2015. Role of IGF1R in Breast Cancer Subtypes, Stemness, and Lineage Differentiation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6, 59.
- FAYARD, E., XUE, G., PARCELLIER, A., BOZULIC, L. & HEMMINGS, B. A. 2010. Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol*, 346, 31-56.
- FERRUCCI, L., CHERUBINI, A., BANDINELLI, S., BARTALI, B., CORSI, A., LAURETANI, F., MARTIN, A., ANDRES-LACUEVA, C., SENIN, U. & GURALNIK, J. M. 2006. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 439-46.
- FRESNO VARA, J. A., CASADO, E., DE CASTRO, J., CEJAS, P., BELDA-INIESTA, C. & GONZALEZ-BARON, M. 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 30, 193-204.
- FRITSCHKE, K. L. 2008. Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 79, 173-5.
- GALINDO-HERNANDEZ, O., GONZALES-VAZQUEZ, C., CORTES-REYNOSA, P., REYES-URIBE, E., CHAVEZ-OCANA, S., REYES-HERNANDEZ, O., SIERRA-MARTINEZ, M. & SALAZAR, E. P. 2015. Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol*, 36, 9649-59.
- GALINDO-HERNANDEZ, O., SERNA-MARQUEZ, N., CASTILLO-SANCHEZ, R. & SALAZAR, E. P. 2014. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 91, 299-310.
- GARNIER, D., MAGNUS, N., MEEHAN, B., KISLINGER, T. & RAK, J. 2013. Qualitative changes in the proteome of extracellular vesicles accompanying cancer cell transition to mesenchymal state. *Exp Cell Res*, 319, 2747-57.
- GAVERT, N. & BEN-ZE'EV, A. 2008. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med*, 14, 199-209.
- GREENING, D. W., GOPAL, S. K., MATHIAS, R. A., LIU, L., SHENG, J., ZHU, H. J. & SIMPSON, R. J. 2015. Emerging roles of exosomes during epithelial-



- mesenchymal transition and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*, 40, 60-71.
- GROSS, J. M. & YEE, D. 2003. The type-1 insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase and breast cancer: biology and therapeutic relevance. *Cancer Metastasis Rev*, 22, 327-36.
- GUMBINER, B. M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 622-34.
- GUO, Y. J., PAN, W. W., LIU, S. B., SHEN, Z. F., XU, Y. & HU, L. L. 2020. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*, 19, 1997-2007.
- HAKULINEN, J., JUNNIKALA, S., SORSA, T. & MERI, S. 2004. Complement inhibitor membrane cofactor protein (MCP; CD46) is constitutively shed from cancer cell membranes in vesicles and converted by a metalloproteinase to a functionally active soluble form. *Eur J Immunol*, 34, 2620-9.
- HANSEN, R. K. & BISSELL, M. J. 2000. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer*, 7, 95-113.
- HE, M., QIN, H., POON, T. C., SZE, S. C., DING, X., CO, N. N., NGAI, S. M., CHAN, T. F. & WONG, N. 2015. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis*, 36, 1008-18.
- HUANG, C., JACOBSON, K. & SCHALLER, M. D. 2004. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*, 117, 4619-28.
- HULIT, J., SUYAMA, K., CHUNG, S., KEREN, R., AGIOSTRATIDOU, G., SHAN, W., DONG, X., WILLIAMS, T. M., LISANTI, M. P., KNUDSEN, K. & HAZAN, R. B. 2007. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res*, 67, 3106-16.
- HYNES, N. E. & WATSON, C. J. 2010. Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003186.
- IRIE, H. Y., PEARLINE, R. V., GRUENEBERG, D., HSIA, M., RAVICHANDRAN, P., KOTHARI, N., NATESAN, S. & BRUGGE, J. S. 2005. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 171, 1023-34.
- JONES, R. A., CAMPBELL, C. I., GUNTHER, E. J., CHODOSH, L. A., PETRIK, J. J., KHOKHA, R. & MOOREHEAD, R. A. 2007. Transgenic overexpression of IGF-IR disrupts mammary ductal morphogenesis and induces tumor formation. *Oncogene*, 26, 1636-44.
- KALRA, H., DRUMMEN, G. P. & MATHIVANAN, S. 2016. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*, 17, 170.
- KANADA, M., BACHMANN, M. H. & CONTAG, C. H. 2016. Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. *Trends Cancer*, 2, 84-94.
- KANG, C., LEROITH, D. & GALLAGHER, E. J. 2018. Diabetes, Obesity, and Breast Cancer. *Endocrinology*, 159, 3801-3812.

- KIM, E. H., WILLETT, W. C., COLDITZ, G. A., HANKINSON, S. E., STAMPFER, M. J., HUNTER, D. J., ROSNER, B. & HOLMES, M. D. 2006. Dietary fat and risk of postmenopausal breast cancer in a 20-year follow-up. *Am J Epidemiol*, 164, 990-7.
- KIM, E. K. & CHOI, E. J. 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 396-405.
- KLEINBERG, D. L., FELDMAN, M. & RUAN, W. 2000. IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5, 7-17.
- KLEINBERG, D. L., WOOD, T. L., FURTH, P. A. & LEE, A. V. 2009. Growth hormone and insulin-like growth factor-I in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions. *Endocr Rev*, 30, 51-74.
- KNAUL, F. M., NIGENDA, G., LOZANO, R., ARREOLA-ORNELAS, H., LANGER, A. & FRENK, J. 2009. [Breast cancer in Mexico: an urgent priority]. *Salud Publica Mex*, 51 Suppl 2, s335-44.
- LAMOUILLE, S., XU, J. & DERYNCK, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 178-96.
- LATIFKAR, A., CERIONE, R. A. & ANTONYAK, M. A. 2018. Probing the mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and function in cancer. *Biochem Soc Trans*, 46, 1137-1146.
- LEAL-ORTA, E., RAMIREZ-RICARDO, J., CORTES-REYNOSA, P., GALINDO-HERNANDEZ, O. & SALAZAR, E. P. 2019. Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells treated with extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid. *J Cell Commun Signal*, 13, 235-244.
- LEE, J. M., DEDHAR, S., KALLURI, R. & THOMPSON, E. W. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*, 172, 973-81.
- LEWITT, M. S., DENT, M. S. & HALL, K. 2014. The Insulin-Like Growth Factor System in Obesity, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Med*, 3, 1561-74.
- LI, H., BATTH, I. S., QU, X., XU, L., SONG, N., WANG, R. & LIU, Y. 2017. IGF-IR signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: overview and new insights. *Mol Cancer*, 16, 6.
- LI, H., XU, L., ZHAO, L., MA, Y., ZHU, Z., LIU, Y. & QU, X. 2015. Insulin-like growth factor-I induces epithelial to mesenchymal transition via GSK-3beta and ZEB2 in the BGC-823 gastric cancer cell line. *Oncol Lett*, 9, 143-148.
- LI, W., HOU, J. Z., NIU, J., XI, Z. Q., MA, C., SUN, H., WANG, C. J., FANG, D., LI, Q. & XIE, S. Q. 2018. Akt1 inhibition promotes breast cancer metastasis through EGFR-mediated beta-catenin nuclear accumulation. *Cell Commun Signal*, 16, 82.
- LIEM, M., ANG, C. S. & MATHIVANAN, S. 2017. Insulin Mediated Activation of PI3K/Akt Signalling Pathway Modifies the Proteomic Cargo of Extracellular Vesicles. *Proteomics*, 17.

- LIMA, S. M., KEHM, R. D. & TERRY, M. B. 2021. Global breast cancer incidence and mortality trends by region, age-groups, and fertility patterns. *EClinicalMedicine*, 38, 100985.
- LIU, F., SUN, Y., LIU, B., LU, J., LI, H., ZHU, H., GAO, H., ZHOU, X. & CHANG, H. 2018. Insulin-like growth factor-1 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by activating survivin. *Oncol Rep*, 40, 952-958.
- LIU, P., CHENG, H., ROBERTS, T. M. & ZHAO, J. J. 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 627-44.
- LU, W. & KANG, Y. 2019. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Dev Cell*, 49, 361-374.
- MATHIVANAN, S., JI, H. & SIMPSON, R. J. 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 73, 1907-20.
- MINCIACCHI, V. R., FREEMAN, M. R. & DI VIZIO, D. 2015. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*, 40, 41-51.
- MOTALLEBNEZHAD, M., AGHEBATI-MALEKI, L., JADIDI-NIARAGH, F., NICKHO, H., SAMADI-KAFIL, H., SHAMSASENJAN, K. & YOUSEFI, M. 2016. The insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in breast cancer: biology and treatment strategies. *Tumour Biol*, 37, 11711-11721.
- MUTSCHELKNAUS, L., AZIMZADEH, O., HEIDER, T., WINKLER, K., VETTER, M., KELL, R., TAPIO, S., MERL-PHAM, J., HUBER, S. M., EDALAT, L., RADULOVIC, V., ANASTASOV, N., ATKINSON, M. J. & MOERTL, S. 2017. Radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells to promote migration of recipient cells. *Sci Rep*, 7, 12423.
- NOOROLYAI, S., SHAJARI, N., BAGHBANI, E., SADREDDINI, S. & BARADARAN, B. 2019. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Gene*, 698, 120-128.
- PAPA, V., GLIOZZO, B., CLARK, G. M., MCGUIRE, W. L., MOORE, D., FUJITA-YAMAGUCHI, Y., VIGNERI, R., GOLDFINE, I. D. & PEZZINO, V. 1993. Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Cancer Res*, 53, 3736-40.
- PLACE, A. E., JIN HUH, S. & POLYAK, K. 2011. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res*, 13, 227.
- PLOTNIKOV, A., ZEHORAI, E., PROCACCIA, S. & SEGER, R. 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 1619-33.
- POLLAK, M. N., SCHERNHAMMER, E. S. & HANKINSON, S. E. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*, 4, 505-18.
- POLYAK, K. & KALLURI, R. 2010. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003244.
- PORTA, C., PAGLINO, C. & MOSCA, A. 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*, 4, 64.


- QU, J. L., QU, X. J., ZHAO, M. F., TENG, Y. E., ZHANG, Y., HOU, K. Z., JIANG, Y. H., YANG, X. H. & LIU, Y. P. 2009. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis*, 41, 875-80.
- RAMIREZ-RICARDO, J., LEAL-ORTA, E., GARCIA-HERNANDEZ, A., DIAZ-ARAGON, R., CORTES-REYNOSA, P., THOMPSON-BONILLA, R. & SALAZAR, E. P. 2021. Role of Src/FAK in migration and invasion mediated by extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid. *Med Oncol*, 38, 40.
- RAMIREZ-RICARDO, J., LEAL-ORTA, E., MARTINEZ-BAEZA, E., ORTIZ-MENDOZA, C., BRETON-MORA, F., HERRERA-TORRES, A., ELIZALDE-ACOSTA, I., CORTES-REYNOSA, P., THOMPSON-BONILLA, R. & PEREZ SALAZAR, E. 2020. Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDAMB231 breast cancer cells. *Mol Med Rep*, 22, 1932-1948.
- RAMOS, J. W. 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2707-19.
- RAPOSO, G. & STOORVOGEL, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200, 373-83.
- REDZIC, J. S., KENDRICK, A. A., BAHMED, K., DAHL, K. D., PEARSON, C. G., ROBINSON, W. A., ROBINSON, S. E., GRANER, M. W. & EISENMESSER, E. Z. 2013. Extracellular vesicles secreted from cancer cell lines stimulate secretion of MMP-9, IL-6, TGF-beta1 and EMMPRIN. *PLoS One*, 8, e71225.
- RIGGIO, M., PERRONE, M. C., POLO, M. L., RODRIGUEZ, M. J., MAY, M., ABBA, M., LANARI, C. & NOVARO, V. 2017. AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep*, 7, 44244.
- RIGIRACCILO, D. C., NOHATA, N., LAPPANO, R., CIRILLO, F., TALIA, M., SCORDAMAGLIA, D., GUTKIND, J. S. & MAGGIOLINI, M. 2020. IGF-1/IGF-1R/FAK/YAP Transduction Signaling Prompts Growth Effects in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Cells. *Cells*, 9.
- ROSKOSKI, R., JR. 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 66, 105-43.
- SAITOH, M. 2018. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem*, 164, 257-264.
- SCHULZ, M., HOFFMANN, K., WEIKERT, C., NOTHLINGS, U., SCHULZE, M. B. & BOEING, H. 2008. 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*, 100, 942-6.
- SECCARECCIA, E. & BRODT, P. 2012. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. *Growth Horm IGF Res*, 22, 193-9.
- SERNA-MARQUEZ, N., DIAZ-ARAGON, R., REYES-URIBE, E., CORTES-REYNOSA, P. & SALAZAR, E. P. 2017. Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Med Oncol*, 34, 111.

- SIMOPOULOS, A. P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233, 674-88.
- SIMOPOULOS, A. P. 2016. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8, 128.
- SINGH, P., ALEX, J. M. & BAST, F. 2014. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. *Med Oncol*, 31, 805.
- SOPEL, M. 2010. The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer. *Folia Morphol (Warsz)*, 69, 1-14.
- SOTO-GUZMAN, A., ROBLEDO, T., LOPEZ-PEREZ, M. & SALAZAR, E. P. 2008. Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 294, 81-91.
- SUN, Y. S., ZHAO, Z., YANG, Z. N., XU, F., LU, H. J., ZHU, Z. Y., SHI, W., JIANG, J., YAO, P. P. & ZHU, H. P. 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, 13, 1387-1397.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- TALIAFERRO-SMITH, L., OBERLICK, E., LIU, T., MCGLOTHEN, T., ALCAIDE, T., TOBIN, R., DONNELLY, S., COMMANDER, R., KLINE, E., NAGARAJU, G. P., HAVEL, L., MARCUS, A., NAHTA, R. & O'REGAN, R. 2015. FAK activation is required for IGF1R-mediated regulation of EMT, migration, and invasion in mesenchymal triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 6, 4757-72.
- TAO, Z., SHI, A., LU, C., SONG, T., ZHANG, Z. & ZHAO, J. 2015. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*, 72, 333-8.
- THIERY, J. P. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 740-6.
- THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
- TOKER, A. 2012. Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Adv Biol Regul*, 52, 78-87.
- TURTURICI, G., TINNIRELLO, R., SCONZO, G. & GERACI, F. 2014. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306, C621-33.
- VADER, P., BREAKFIELD, X. O. & WOOD, M. J. 2014. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med*, 20, 385-93.
- VAN DER MIJN, J. C., SOL, N., MELLEMA, W., JIMENEZ, C. R., PIERSMA, S. R., DEKKER, H., SCHUTTE, L. M., SMIT, E. F., BROXTERMAN, H. J., SKOG, J., TANNOUS, B. A., WURDINGER, T. & VERHEUL, H. M. 2014. Analysis of AKT and ERK1/2 protein kinases in extracellular vesicles isolated from blood of patients with cancer. *J Extracell Vesicles*, 3, 25657.
- VAN NIEL, G., D'ANGELO, G. & RAPOSO, G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 213-228.

- VISVADER, J. E. 2009. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*, 23, 2563-77.
- VIVANCO, I. & SAWYERS, C. L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2, 489-501.
- WALSH, L. A. & DAMJANOVSKI, S. 2011. IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF-beta1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. *Cell Commun Signal*, 9, 10.
- WANG, B., TAN, Z. & GUAN, F. 2019. Tumor-Derived Exosomes Mediate the Instability of Cadherins and Promote Tumor Progression. *Int J Mol Sci*, 20.
- WANG, R., LI, H., GUO, X., WANG, Z., LIANG, S. & DANG, C. 2016. IGF-I Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition via the IGF-IR-Src-MicroRNA-30a-E-Cadherin Pathway in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Oncol Res*, 24, 225-31.
- WEN, Y. Y., LIU, W. T., SUN, H. R., GE, X., SHI, Z. M., WANG, M., LI, W., ZHANG, J. Y., LIU, L. Z. & JIANG, B. H. 2017. IGF-1-mediated PKM2/beta-catenin/miR-152 regulatory circuit in breast cancer. *Sci Rep*, 7, 15897.
- WOOD, T. L. & YEE, D. 2000. Introduction: IGFs and IGFs in the normal mammary gland and in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5, 1-5.
- XU, W., YANG, Z. & LU, N. 2015. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adh Migr*, 9, 317-24.
- XUE, G. & HEMMING, B. A. 2013. PKB/Akt-dependent regulation of cell motility. *J Natl Cancer Inst*, 105, 393-404.
- YANG, S. H., SHARROCKS, A. D. & WHITMARSH, A. J. 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, 513, 1-13.
- YONEZAWA, T., KATO, K. & OBARA, Y. 2004. Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun*, 314, 805-9.
- YOON, Y. J., KIM, D. K., YOON, C. M., PARK, J., KIM, Y. K., ROH, T. Y. & GHO, Y. S. 2014. Egr-1 activation by cancer-derived extracellular vesicles promotes endothelial cell migration via ERK1/2 and JNK signaling pathways. *PLoS One*, 9, e115170.
- ZHANG, W. & LIU, H. T. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*, 12, 9-18.
- ZHAO, X. & GUAN, J. L. 2011. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 610-5.
- ZIELINSKA, H. A., BAHL, A., HOLLY, J. M. & PERKS, C. M. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: a role for insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 3? *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 7, 9-19.



# Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells treated with extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid

Elizabeth Leal-Orta<sup>1</sup> · Javier Ramirez-Ricardo<sup>1</sup> · Pedro Cortes-Reynosa<sup>1</sup> · Octavio Galindo-Hernandez<sup>2</sup> · Eduardo Perez Salazar<sup>1</sup> 

Received: 8 February 2018 / Accepted: 4 October 2018  
© The International CCN Society 2018

## Abstract

In breast cancer cells, the linoleic acid (LA), an  $\omega$ -6 essential polyunsaturated fatty acid, induces a variety of biological processes, including migration and invasion. Extracellular vesicles (EVs) are structures released by normal and malignant cells into extracellular space, and their function is dependent on their cargo and the cell type from which are secreted. Particularly, the EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells treated with LA promote an epithelial-mesenchymal-transition (EMT)-like process in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A. Here, we found that EVs isolated from supernatants of MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with 90  $\mu$ M LA induces activation of Akt2, FAK and ERK1/2 in MCF10A cells. In addition, EVs induces migration through a PI3K, Akt and ERK1/2-dependent pathway, whereas invasion is dependent on PI3K activity.

**Keywords** Breast cancer · Extracellular vesicles · Linoleic acid · PI3K/Akt · Migration · Invasion · MCF10A cells

## Introduction

The free fatty acids (FFAs) are utilized as source of energy and synthesis of milk lipids in the epithelial cells of mammary gland. In breast cancer cells the FFAs, through activation of their receptors, are able to mediate a variety of cellular processes including proliferation, migration and invasion (Soto-Guzman et al. 2010; Yonezawa et al. 2004). The linoleic acid (LA) is an essential polyunsaturated fatty acid (PUFA), and it represents the main PUFA in the most occidental diets. Moreover, LA can be a precursor of eicosanoids, because it is able to be converted to arachidonic acid (AA), and then AA can be converted to a variety of eicosanoids. Therefore, LA is

able to induce inappropriate inflammatory responses, which contribute to development of various chronic diseases (Calder 2001; Fritsche 2008; Simopoulos 2006). Particularly, LA induces proliferation, migration and invasion in breast cancer cells and an epithelial-mesenchymal-transition (EMT)-like process in MCF10A mammary non-tumorigenic epithelial cells (Byon et al. 2009; Espinosa-Neira et al. 2011; Serna-Marquez et al. 2013, 2017; Yonezawa et al. 2008).

Extracellular vesicles (EVs) are structures enclosed by a lipid bilayer that are released by normal and malignant cells into extracellular space. The EVs function is dependent on their cargo and the cell type from which are secreted (Muralidharan-Chari et al. 2010; Penformis et al. 2016). The EVs are a broad and heterogeneous population of vesicles, which have been classically divided by size and origin in three groups: exosomes, microvesicles and apoptotic bodies (Ciardiello et al. 2016; Iraci et al. 2016; Minciacchi et al. 2015). Exosomes are the smaller vesicles (30–100 nm), homogeneous in size and released by endosomal compartments, whereas microvesicles are a heterogeneous population of larger vesicles (100–1000 nm), released from plasma membranes via membrane blebbing (Ciardiello et al. 2016; Kowal et al. 2014; Minciacchi et al. 2015). The EVs play important roles in the pathogenesis of various diseases, such as cancer (Ciardiello

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12079-018-0490-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Eduardo Perez Salazar  
jperez@cell.cinvestav.mx

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN, Av. IPN # 2508, 07360 Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico

et al. 2016; Webber et al. 2015). Particularly, EVs from breast cancer patients and from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with LA promote an EMT-like process in MCF10A cells (Galindo-Hernandez et al. 2014, 2015).

A variety of cellular processes in both normal and tumor cells are mediated by activation of the PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) signaling pathway, such as proliferation, growth, survival and angiogenesis (Dillon et al. 2007; Yang et al. 2016). The PI3K family consists of three lipid kinases that originates phosphoinositol lipids, which act as second messengers in a number of intracellular signaling pathways, including PDK1 and Akt activation (Liu et al. 2009; Vanhaesebroeck et al. 2010). Akt family is the primary downstream mediator of PI3K, and it is constituted for three serine-threonine kinases, namely Akt1, Akt2 and Akt3 (Clark and Toker 2014; Matheny and Adamo 2009). Activation of Akt members is given by their phosphorylation at threonine (Thr)-308, Thr-309 and Thr-305, and their phosphorylation at serine (Ser)-473, Ser-474 and Ser-472 in Akt1, Akt2 and Akt3 respectively (Clark and Toker 2014; Dillon et al. 2007; Yang et al. 2016).

The present work demonstrate that EVs isolated from supernatants of MDA-MB-231 breast cancer cells treated with 90  $\mu$ M LA induces activation of Akt2, FAK and ERK1/2 in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A. In addition, EVs induces migration via PI3K, Akt and ERK1/2 activity, whereas invasion requires PI3K activity.

## Materials and methods

### Materials

LA sodium salt (99% purity) and A6730 were from Sigma (St. Louis MO). Wortmannin and ERK inhibitor (3-(2-aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione hydrochloride, HCl) were from Merck Millipore (Rockland, MA). FAK antibody (Ab) C-20 was from Calbiochem-Merck Millipore (Darmstadt, Germany). LY294002, Akt2 Ab F-7, Akt1 Ab 5C10, CD9 Ab C-4 and major histocompatibility complex class I (MHC-I) Ab BRA23/9 were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Flotillin-2 Ab and basement membrane matrix (BD Matrigel) were from BD Biosciences (Bedford, MA). Phosphospecific Ab to tyrosine (Tyr)-397 of FAK (anti-p-FAK Ab) was from Invitrogen (Waltham, MA). Phosphospecific Ab E10 to Thr-202 and Tyr-204 of ERK1/2 (anti-p-ERK1/2), phosphospecific Ab to Ser-473 of Akt (anti-p-Akt Ab) and ERK1/2 Ab were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Actin Ab was kindly provided for Dr. Jose-Manuel Hernandez (Cinvestav-IPN).

### Cell culture

The human MDA-MB-231 breast cancer cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 3.7 g/l sodium bicarbonate, 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. The human MCF10A mammary non-tumorigenic epithelial cells were cultured in DMEM/F12 medium (3:1) supplemented with 10% FBS, 0.5  $\mu$ g/ml hydrocortisone, 20 ng/ml recombinant epidermal growth factor (EGF), 10  $\mu$ g/ml insulin and antibiotics. Cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C.

The MDA-MB-231 cells were starved in DMEM without FBS for 24 h; whereas MCF10A cells were starved in DMEM/F12 without FBS, hydrocortisone, EGF and insulin for 18 h, before treatment with LA or EVs respectively.

### Stimulation of MDA-MB-231 cells with LA

Cell stimulation was performed as described previously (Galindo-Hernandez et al. 2014). After starvation,  $8 \times 10^6$  MDA-MB-231 cells (confluent cultures) were stimulated without or with 90  $\mu$ M LA for 48 h, and then conditioned medium was collected.

### Isolation of EVs from conditioned medium

Isolation of EVs from conditioned medium of MDA-MB-231 cells stimulated with LA was performed as described previously (Abache et al. 2007; Escola et al. 1998). Conditioned medium was centrifuged twice for 10 min at 600 g and supernatants were obtained. Next, supernatants were carefully aspirated and then sequentially centrifuged at 2000 g twice for 15 min, once at 10,000 g for 30 min and once at 100,000 g for 60 min (EVs fraction). The EVs fraction obtained was enriched in exosomes and microvesicles.

The absolute number of EVs was determined by using TruCOUNT tubes as described previously (Galindo-Hernandez et al. 2014).

### Stimulation of MCF10A cells with EV fractions

Cultures of MCF10A cells were washed twice with PBS and stimulated with EV fractions from  $8 \times 10^6$  MDA-MB-231 cells unstimulated or stimulated with 90  $\mu$ M LA for 48 h (~52,450 EVs / EV fraction / Experimental condition). After stimulation, medium was collected and cells were solubilized in 0.5 ml of ice-cold RIPA buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGT4, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% SDS and 1 mM PMSF) (Fig. 1S). The protein level of samples was determined by the micro-Bradford protein assay.



## Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was performed as described previously (Baran et al. 2010). EV fractions were adsorbed for 5 min on carbon coated copper grids with mesh formvar (0.3%). The grids were exposed for 30 s on a drop of 2% uranyl acetate for negative staining, and excess of fluid was removed using filter paper. The grids were air dried and analyzed using a JEM-1400 transmission electron microscope (Jeol, Japan) operated at 80 kV and supplied with a digital camera Veleta (Olympus SIS, Germany).

## Immunoprecipitation

Lysates were clarified by centrifugation at 12000 rpm for 10 min. Supernatants were transferred to fresh tubes and equal amounts of protein were immunoprecipitated overnight at 4 °C with protein A-agarose linked to anti-Akt1 Ab or anti-Akt2 Ab. Immunoprecipitates were washed three times with RIPA buffer and extracted in SDS-PAGE sample buffer by boiling 5 min and resolved by SDS-PAGE.

## Western blotting

Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE using 10% separating gels followed by transfer to nitrocellulose membranes. After transfer, membranes were blocked using 5% non-fat dried milk in PBS pH 7.2/0.1% Tween 20 (wash buffer), and incubated overnight at 4 °C with primary Ab. Membranes were washed three times with wash buffer and incubated with secondary Ab (horseradish peroxidase-conjugated Abs) (1:5000) for 2 h at 22 °C. After washing three times with wash buffer, the immunoreactive bands were visualized using ECL detection reagent. Autoradiograms were scanned and the labeled bands were quantified using the ImageJ software (NIH, USA).

## Scratch-wound assay

Confluent cultures of MCF10A cells were treated for 2 h with 12 μM mitomycin C to inhibit proliferation during the experiment. Cell cultures were scratch-wounded using a sterile 200 μl pipette tip, washed twice with PBS and re-fed with DMEM/F12 containing EV fractions from  $8 \times 10^6$  MDA-MB-231 cells unstimulated or stimulated with LA for 48 h (~52,450 EVs / EV fraction / Experimental condition). The progress of cell migration into the wound was photographed at 48 h using an inverted microscope coupled to a camera. Migration was quantified using the ImageJ software (NIH, USA).

## Chemotactic migration assay (Boyden chamber method)

Chemotactic migration assays were performed in 24-well plates containing 12 cell culture inserts with 8 μm pore size (Costar, Corning, Inc). MCF10A cells were treated for 2 h with 12 μM mitomycin C, and cells were re-suspended in DMEM/F12 and seeded into the upper chamber at  $1 \times 10^5$  cells/well. EV fractions from  $8 \times 10^6$  MDA-MB-231 cells unstimulated or stimulated with LA for 48 h (~52,450 EVs / EV fraction / Experimental condition) were added to the lower chamber. After 48 h of incubation at 37 °C, nonmigrated cells were removed from the upper side of the membrane with cotton swabs, and the cells on the lower surface of the membrane were fixed in cold methanol for 5 min. The membrane was stained with 0.1% crystal violet in PBS. The dye was eluted with 200 μl of 10% acetic acid, and the absorbance at 600 nm was measured. Background value was obtained from wells without cells.

## Invasion assays

Invasion assays were performed by the modified Boyden chamber method in 24-well plates containing 12 cell culture inserts with 8 μm pore size (Costar, Corning, Inc). Briefly, 50 μl BD Matrigel was added into culture inserts and kept overnight at 37 °C. MCF10A cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells per insert in serum-free DMEM/F12 on the top chamber. The lower chamber contained 600 μl DMEM/F12 with EVs from  $8 \times 10^6$  MDA-MB-231 cells untreated or treated with 90 μM LA (~52,450 EVs / EV fraction / Experimental condition). Boyden chamber were incubated for 72 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub>, atmosphere and then cells and matrigel on the upper surface of membrane were removed with cotton swabs, and the cells on the lower surface of the membrane were washed and fixed in methanol for 5 min. Number of invaded cells was estimated by staining with 0.1% crystal violet in PBS. The dye was eluted with 500 μl of 10% acetic acid, and the absorbance at 600 nm was measured. Background value was obtained from wells without cells.

## EVs uptake assay

EVs were labeled using the CellMasK Orange plasma membrane stain kit, according to the manufacturer's instructions. Briefly, EV fractions (~52,450 EVs / Experimental condition) were incubated in DMEM with CellMask Orange (2.5 μg/ml) for 30 min, and they were washed twice with DMEM by centrifugation at 100,000 g for 60 min. The MCF10A cells were treated with the labeled EVs for 0.5, 1 and 4 h in the absence or presence of inhibitors, and then they were rinsed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were trypsinized and washed twice with PBS, re-suspended in

PBS-1% BSA and analyzed with a cytometer Fortessa (Dako Cytomation). Data analysis was performed with the Summit 4.3 software.

## Interference RNA

Akt2 expression was silenced in MCF10A cells by using the silencer siRNAs (0.3  $\mu$ M Akt2 siRNAs) kit from Santa Cruz Biotechnology, according to the manufacture's guidelines. One control of scramble siRNAs (0.3  $\mu$ M) was included.

## Statistical analysis

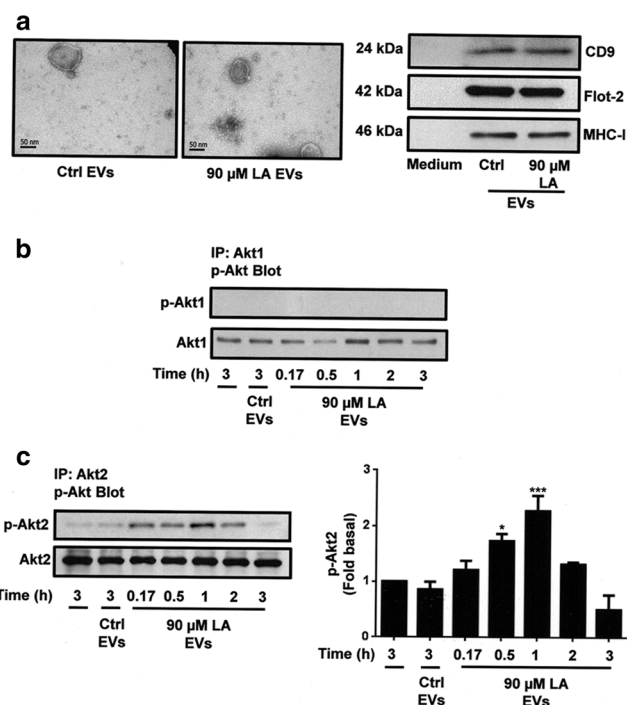
Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Knewman-Keuls's multiple comparison test. Statistical probability of  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

### EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induce Akt2 activation in MCF10A cells

First, we isolated EVs from conditioned medium of MDA-MB-231 cells untreated or treated with 90  $\mu$ M LA for 48 h by using differential centrifugation. To substantiate that those fractions were enriched in EVs, they were analyzed by TEM and Western blotting with anti-CD9 Ab, anti-Flotillin-2 Ab and anti-MHC-I Ab. As shown in Fig. 1a, EV fractions showed a homogeneous population of spherical vesicles with sizes ranging from 30 to 300 nm, and they express CD9, Flotillin-2 and MHC-I proteins. In contrast, these proteins were undetectable in depleted medium of EVs.

We studied whether EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induced Akt1 and Akt2 activation, given by their phosphorylation at Ser-473 and Ser-474 respectively. Cultures of MCF10A cells were treated for various times with EV fractions from MDA-MB-231 cells unstimulated or stimulated with LA, and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Akt1 Ab or anti-Akt2 Ab and the immunocomplexes were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-p-Akt Ab, which recognized phosphorylation at Ser-473 and Ser-474 of Akt1 and Akt2 respectively. Our findings demonstrated that treatment of MCF10A cells with EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA did not induce an increase on Akt1 phosphorylation at Ser-473 (p-Akt1), whereas it induced an increase on Akt2 phosphorylation at Ser-474 (p-Akt2) (Fig. 1b and c, upper panel). Western blotting of same membranes with anti-Akt1 Ab and anti-Akt2 Ab were used as loading controls (Fig. 1b and c, lower panel).



**Fig. 1** EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induces activation of Akt2 in MCF10A cells. Panel a. Analysis by transmission electron microscopy and Western blotting with anti-CD9 Ab, anti-Flotillin-2 (Flot-2) Ab and anti-MHC-I Ab of EV fractions from MDA-MB-231 cells unstimulated (Ctrl EVs) or stimulated with LA (90  $\mu$ M LA EVs). Panel b and c. Lysates from MCF10A cells stimulated with EV fractions from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA for various times were analyzed by IP with anti-Akt1 Ab or anti-Akt2 Ab, and immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-p-Akt Ab. Membranes were reprobed with anti-Akt1 Ab or anti-Akt2 Ab. One control of untreated MCF10A cells was included. Graph is the mean  $\pm$  S.D. and is expressed as fold of p-Akt2 above Ctrl EVs value. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl EVs. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$

Since, EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induced Akt2 activation at 0.5 and 1 h of treatment; we determined whether EVs from untreated cells induced Akt2 activation at different times of stimulation. Our findings demonstrated that EVs from untreated cells induced a weak activation of Akt2 at 0.17, 0.5 and 1 h of treatment (Supplemental figure, 2S-A).

### PI3K is required for Akt2 activation induced by EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA in MCF10A cells

We determined whether Akt2 activation required PI3K activity, because Akt is a downstream mediator of PI3K. MCF10A cells were treated for 2 h with 60 nM wortmannin or 10  $\mu$ M LY294002, which are specific inhibitors of PI3K activity, and then stimulated for 1 h with EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA and lysed. Lysates were immunoprecipitated with anti-Akt2 Ab, followed by Western blotting with anti-p-

Akt Ab. Our findings showed that EVs induced p-Akt2 and it required the activity of PI3K in MCF10A cells (Fig. 2a).

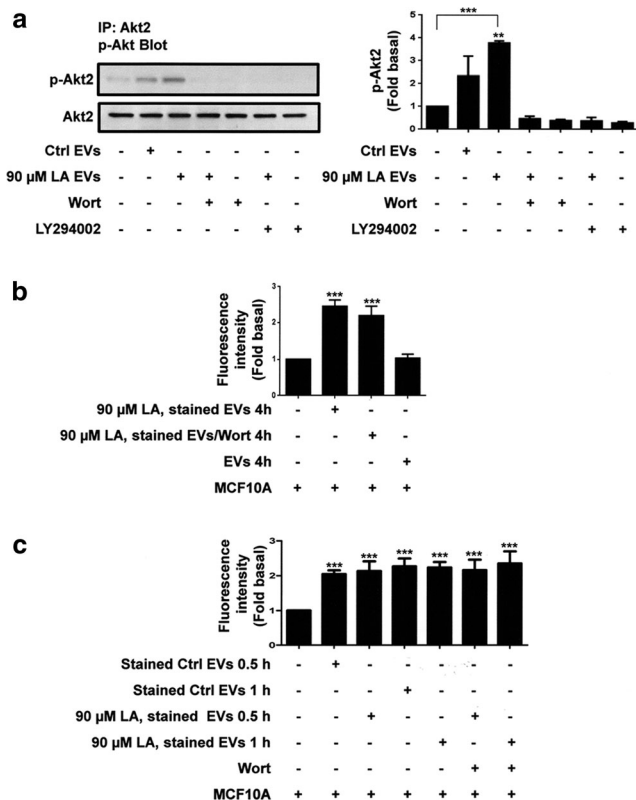
Next, we studied whether EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA were taken up by MCF10A cells and the role of PI3K. We labeled EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA with CellMasK Orange dye. Next, cultures of MCF10A cells were untreated or treated with 60 nM wortmannin for 2 h and then they were treated with stained EVs for 4 h. Cells were analyzed for their fluorescent intensity by flow cytometry. As illustrated in Fig. 2b, EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA were taken up by MCF10A cells, whereas treatment with wortmannin did not inhibit the uptake of EVs (Fig. 2b).

To further substantiate that EVs were taken up by MCF10A cells at different times, we performed taken up assays using MCF10A cells untreated or treated with wortmannin and with stained EVs from MDA-MB-231 cells untreated and treated with LA for 0.5 and 1 h. Our findings demonstrated that EVs from MDA-MB-231 cells untreated and treated with LA were taken up by MCF10A cells at 0.5 and 1 of treatment, and incubation with wortmannin did not inhibit the uptake of EVs (Fig. 2c).

### Role of PI3K/Akt2 in migration induced by EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA in MCF10A cells

EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induce migration of MCF10A cells (Galindo-Hernandez et al. 2014). We studied the role of PI3K and Akt on migration. Cultures of MCF10A cells were treated with two specific PI3K inhibitors (60 nM wortmannin and 10  $\mu$ M LY294002) and one specific inhibitor of Akt1/2 (2  $\mu$ M A6730) for 1 h, and then they were scratch-wounded and stimulated with EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA. Our findings showed that EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induced migration through a PI3K- and Akt1/2-dependent pathway in MCF10A cells (Fig. 3a and b).

To further substantiate our findings, cell migration assays were performed by using the Boyden chamber method and MCF10A cells treated with wortmannin and A6730, followed of stimulation with EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA. As illustrated in Fig. 3c, migration induced by EVs requires the activity of PI3K and Akt1/2 in MCF10A cells. Next we studied the role of Akt2 in migration mediated by EVs. Akt2 expression was knocked down by using siRNA against Akt2 in MCF10A cells (Fig. 4a). Next, these MCF10A cells were scratch-wounded and stimulated with EVs from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA. As illustrated in Fig. 4b, migration induced by EVs was partly dependent in Akt2 expression in MCF10A cells.

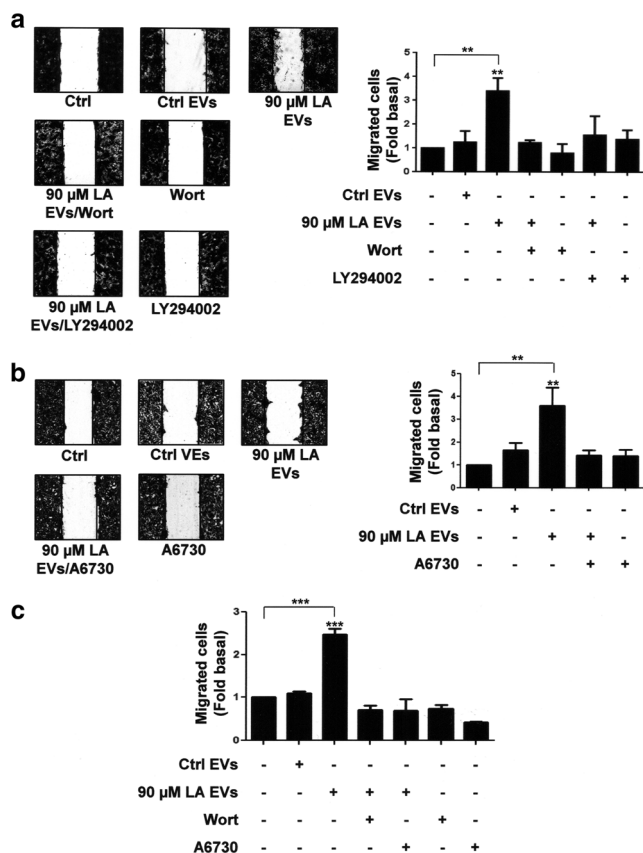


**Fig. 2** Role of PI3K in Akt2 activation induced by EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA in MCF10A cells. Panel a. Lysates from MCF10A cells treated with Wortmannin (Wort) or LY294002 and stimulated with EVs from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA were analyzed by IP with anti-Akt2 Ab, and immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-p-Akt Ab. Membranes were reprobed with anti-Akt2 Ab. One control of untreated MCF10A cells was included. Panel b. Flow cytometric analysis of MCF10A cells pretreated with Wort and treated with unstained (EVs) or stained EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA for 4 h. Panel c. Flow cytometric analysis of MCF10A cells pretreated with Wort and treated with stained EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA for 0.5 and 1 h. Graphs are the mean  $\pm$  S.D. and are expressed as fold of p-Akt2 or mean fluorescence intensities above Ctrl EVs or unstained EVs. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl EVs and control (unstimulated cells). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

### EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induce invasion in MCF10A cells

Since EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induced invasion in MCF10A cells (Galindo-Hernandez et al. 2014), we determined the role of PI3K in the invasion process. By using the Boyden chamber method, invasion assays were performed with MCF10A cells treated with 60 nM wortmannin for 2 h and stimulated with EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA. Our findings showed that treatment with wortmannin inhibited the invasion induced by EVs in MCF10A cells.

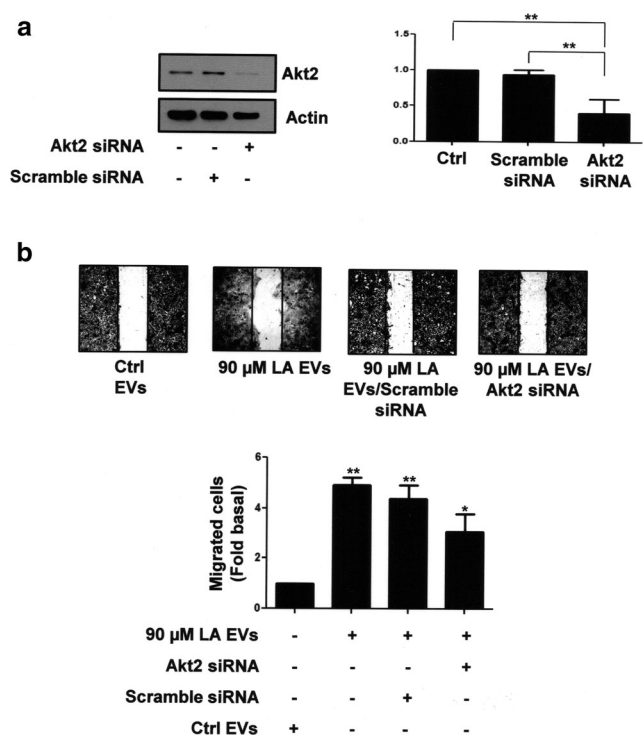
FAK and ERK1/2 play a pivotal role in migration and invasion (Di et al. 2015; Zhao and Guan 2011). We determined whether EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA were



**Fig. 3** Role of PI3K and Akt in migration induced by EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA in MCF10A cells. Panel a and b. Cultures of MCF10A cells were scratch-wounded and pretreated with Wort, LY294002 or A6730 and then treated with EVs from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA. Panel c. Migration assays were performed by using the Boyden chamber method and MCF10A cells treated with Wort and LY294002 and then stimulated with EVs from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA. One control of untreated MCF10A cells was included. Graphs are the mean ± S.D. and are expressed as fold of migrated cells above Ctrl EVs. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl EVs and control. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

able to induce activation of FAK and ERK1/2 in MCF10A cells. Cultures of MCF10A cells were treated for various times with EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA and lysed. Lysates were analyzed by Western blotting with anti-p-FAK Ab and anti-p-ERK1/2 Ab. As illustrated in Fig. 5b and c (upper panel), EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induced activation of FAK and ERK1/2, given by their Tyr phosphorylation, in MCF10A cells. Membranes were reprobed with anti-FAK Ab and anti-ERK1/2 Ab as loading controls (Fig. 5b and c, lower panel).

Since, EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induced FAK activation at 1 h of treatment and ERK1/2 activation at 0.5, 1 and 2 h of treatment; we determined whether EVs from untreated cells also induced activation of FAK and ERK1/2 at different times of stimulation. Our findings demonstrated that EVs from untreated cells did not induce



**Fig. 4** Role of Akt2 in migration induced by EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA in MCF10A cells. Panel a. Akt2 expression of MCF10A cells transfected with Akt2-specific or scramble siRNAs was analyzed by Western blotting with anti-Akt2 Ab. One control of actin was included. Graph is the mean ± S.D. and is expressed as fold of Akt2 under Ctrl. Panel b. Migration assays were performed with MCF10A cells transfected with Akt2 siRNAs or scramble siRNAs and treated with EVs from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA. Graph is the mean ± S.D. and is expressed as fold of migrated cells above Ctrl EVs. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl, scramble siRNA and Ctrl EVs. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01

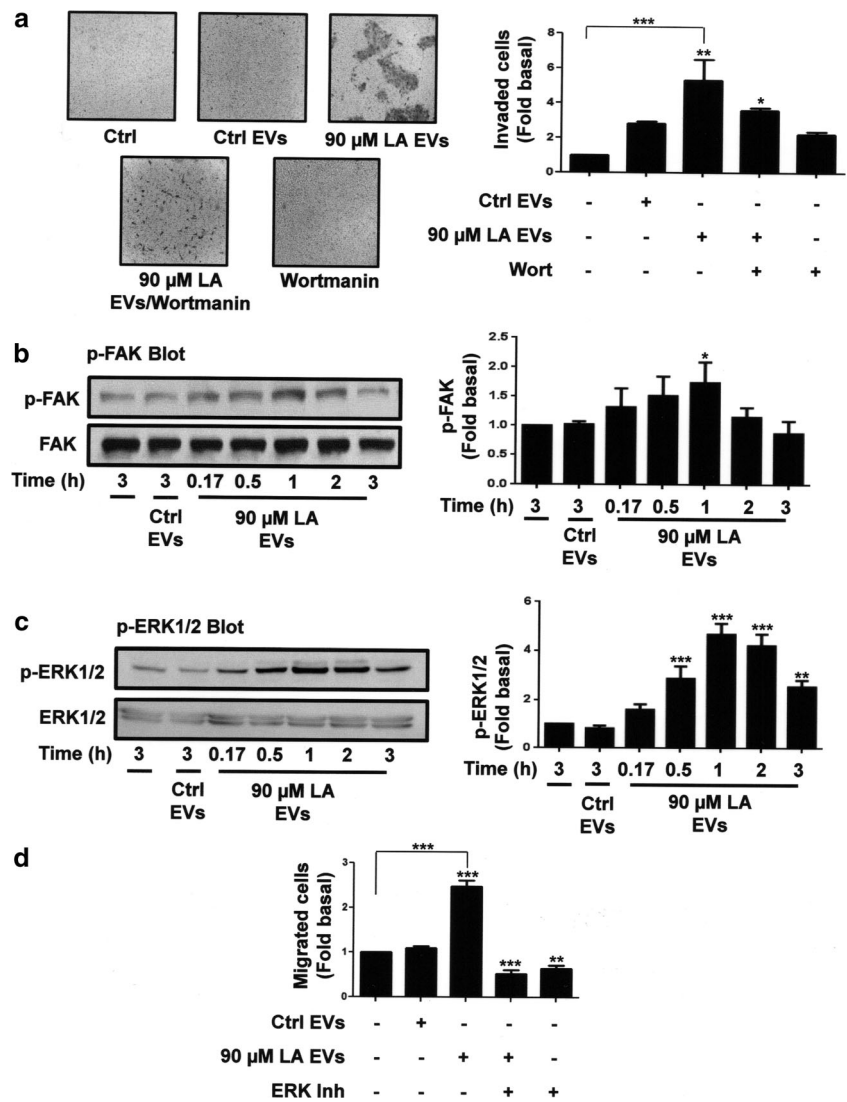
activation of FAK and ERK1/2 at 0.17, 0.5, 1 and 2 h of treatment (Supplemental figure, 2S-B,C).

Next, we studied the role of ERK1/2 in migration. By using the Boyden chamber method, migration assays were performed with MCF10A cells treated for 1 h with 100 μM ERK inhibitor, and then treated with EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA. As shown in Fig. 5d, EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induced migration through an ERK1/2-dependent pathway in MCF10A cells.

## Discussion

An increased risk of breast cancer has been related with a diet rich in fatty acids including saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids and ω-6 PUFA (Kim et al. 2006; Schulz et al. 2008). The major PUFA in occidental diets is the LA, which has been estimated to be consumed at 15–20 g per day per person, with a plasma concentration of ~275 μM (Anderson et al. 2009; Ferrucci et al. 2006). In MDA-MB-

**Fig. 5** EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induces invasion of MCF10A cells through a PI3K-dependent pathway. Panel a. Invasion assays were performed with MCF10A cells pretreated with Wort and stimulated with EVs from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA. Representative pictures of Boyden chamber membranes are included. Panel b and c. Lysates from MCF10A cells stimulated with EVs from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA for various times were analyzed by Western blotting with anti-p-FAK Ab or anti-p-ERK1/2 Ab. Membranes were further analyzed with anti-FAK Ab and anti-ERK1/2 Ab. A control of untreated MCF10A cells was included. Panel d. Migration assays were performed by using the Boyden chamber method and MCF10A cells pretreated with ERK inhibitor and stimulated with EVs from MDA-MB-231 cells untreated or treated with LA. Graphs are the mean  $\pm$  S.D. and are expressed as the fold of invasion, p-FAK, p-ERK1/2 or migrated cells above Ctrl EVs. Asterisks indicate comparisons made to Ctrl EVs and control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$



231 breast cancer cells, stimulation with 90  $\mu$ M LA induces migration and invasion (Serna-Marquez et al. 2013, 2017).

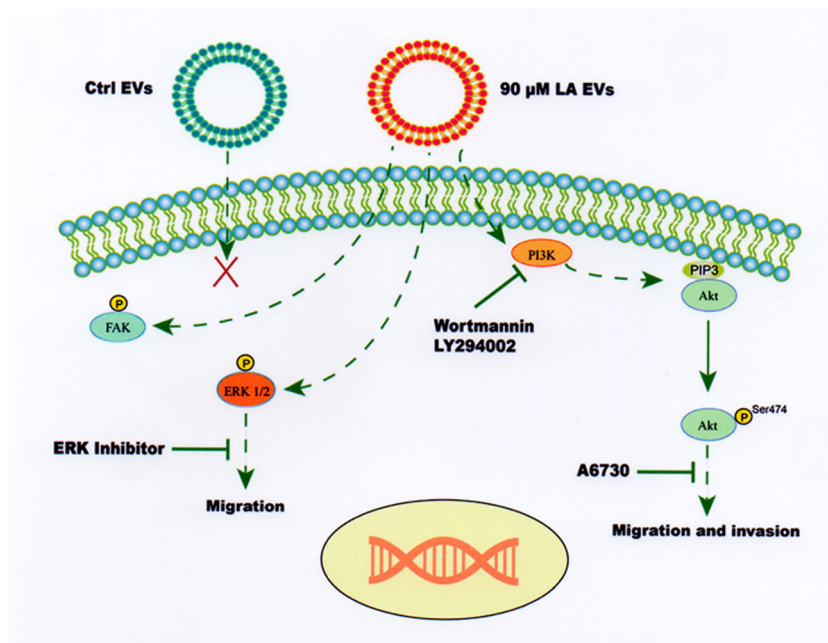
Cancer cells share proteins and genetic information through secretion and uptake of EVs, which are able to transfer bioactive molecules including nucleic acids, chemokine receptors, growth factor receptors, functional transcription factors, and other transmembrane proteins (Ciardiello et al. 2016; Minciacchi et al. 2015). We previously reported that EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with 90  $\mu$ M LA promotes an EMT-like process in MCF10A cells (Galindo-Hernandez et al. 2014). However, the signal transduction pathways that mediate migration and invasion induced by EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA in MCF10A cells remain to be studied.

The PI3K/Akt pathway mediates several biological processes including survival and cancer development (Toker 2012). Particularly, PI3Ks mediate a variety of cellular processes, such as migration and invasion (Cantley 2002;

Vivanco and Sawyers 2002). We demonstrate here that EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA mediates migration and invasion through a PI3K-dependent activity in MCF10A cells. Interestingly, PI3K activity does not mediate the uptake of EVs from MDA-MB-231 cell untreated and treated with LA in MCF10A cells. Since, treatment with EVs from untreated MDA-MB-231 cells does not induce migration and invasion, we propose that these EVs do not induce PI3K activation.

In addition, EVs from MDA-MB-231 cells untreated and treated with LA are uptaken for MCF10A cells at similar amounts. Therefore, we propose that treatment of MDA-MB-231 cells with LA induces the presence of cargos in the EVs, which are able to mediate migration and invasion through a PI3K-dependent pathway in MCF10A cells. Supporting our proposal, exosomes derived from the human gastric cancer cell line SGC7901 induce Akt activation and proliferation in SGC7901 and BGC823 human gastric cancer

**Fig. 6 Model of role of PI3K/ Akt and/or ERK1/2 on migration and invasion induced by treatment with EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA in MCF10A cells**



cells, whereas proliferation is dependent of PI3K activity (Qu et al. 2009).

Studies in genetically engineered mouse models and breast cancer cell lines demonstrate that Akt members mediate isoform specific cell functions. In a mouse model of mammary tumorigenesis, Akt1 promotes tumorigenesis and suppresses invasion; whereas Akt2 increases invasion, metastasis and promotes an EMT process in breast and ovarian cancer cells (Clark and Toker 2014; Irie et al. 2005). We demonstrate that just the EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induce Akt2 activation and it requires PI3K activity in MCF10A cells. In addition, EVs induce migration, and treatment with an Akt1/2 inhibitor completely inhibits migration. However, inhibition of Akt2 expression partly inhibits migration in MCF10A cells. We propose that EVs induce migration through an Akt2-dependent pathway, but inhibition of Akt2 expression promotes that Akt1 partly mediates the migration induced by EVs in MCF10A cells. Supporting our proposal, exosomes from hepatocellular carcinoma cell lines induces migration and Akt1/2 activation in an immortalized hepatocyte line (He et al. 2015).

During EMT process, epithelial cells gain the capacity to migrate and invade through extracellular matrix, which is mediated by activation of cell surface receptors and non-receptor kinases, including FAK and ERK1/2 (Avizienyte and Frame 2005). Particularly, FAK has been associated with tumorigenesis and metastasis, because it regulates survival, migration, invasion, angiogenesis and the EMT process (Zhao and Guan 2011). In addition, ERK1/2 are associated with migration, because they phosphorylate FAK at Ser or Thr residues (Huang et al. 2004). Our results demonstrate that EVs from MDA-MB-231 cells treated with LA induce FAK and ERK1/2

activation, and that migration is dependent on ERK1/2 activity in MCF10A cells. In agreement with our findings, embryonic stem cells secrete microvesicles, which promote migration and FAK and JNK activation in trophoblast during the implantation process (Desrochers et al. 2016). Moreover, exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells induce ERK1/2 activation and migration in hepatocellular cancer cells HepG2, whereas EVs from colorectal cancer cells induce migration via ERK1/2 and JNK activation in endothelial cells (Chiba et al. 2016; Yoon et al. 2014).

We propose that treatment of MDA-MB-231 cells with LA promotes changes in molecular composition of EVs, which induces Akt2 activation and the migration/invasion process through a PI3K/Akt-dependent pathway in MCF10A cells. Supporting our proposal, modifications in culture conditions modify the composition of EVs in endothelial and tumor cells, whereas radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells, which promote migration of target cells (Colombo et al. 2014; Mutschelknaus et al. 2017).

In summary, our findings demonstrate, for the first time, that EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induce migration through a PI3K/Akt- and ERK1/2-dependent pathway in MCF10A cells. Moreover, EVs also promote FAK and ERK1/2 activation and invasion through a PI3K-dependent pathway. In contrast, EVs from unstimulated MDA-MB-231 cells do not induce activation of PI3K, Akt, FAK and ERK in MCF10A cells. Our findings are depicted in Fig. 6.

**Acknowledgements** This work was financed by grants from CONACYT-Mexico (255429) and CONACYT-FOSISS-Mexico (Salud-2015-1-261637). E. L-O and J. R-R were financed by Predoctoral training grants from CONACYT-Mexico.

## Compliance with ethical standards

**Declaration of interest** Authors declare that there is not conflict of interest.

## References

- Abache T, Le Naour F, Planchon S, Harper F, Boucheix C, Rubinstein E (2007) The transferrin receptor and the tetraspanin web molecules CD9, CD81, and CD9P-1 are differentially sorted into exosomes after TPA treatment of K562 cells. *J Cell Biochem* 102:650–664
- Anderson SG, Sanders TA, Cruickshank JK (2009) Plasma fatty acid composition as a predictor of arterial stiffness and mortality. *Hypertension* 53:839–845
- Avizienyte E, Frame MC (2005) Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 17:542–547
- Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, Szatanek R, Zembala M, Barbasz J, Czupryna A, Szczepanik A, Zembala M (2010) Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 59:841–850
- Byon CH, Hardy RW, Ren C, Ponnazhagan S, Welch DR, McDonald JM, Chen Y (2009) Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4. *Lab Invest* 89:1221–1228
- Calder PC (2001) Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 36:1007–1024
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655–1657
- Chiba M, Watanabe N, Watanabe M, Sakamoto M, Sato A, Fujisaki M, Kubota S, Monzen S, Maruyama A, Nanashima N, Kashiwakura I, Nakamura T (2016) Exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells promote cell migration in HepG2 hepatocellular cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol* 48:305–312
- Ciardello C, Cavallini L, Spinelli C, Yang J, Reis-Sobreiro M, de Candia P, Minciocchi VR, Di Vizio D (2016) Focus on extracellular vesicles: new frontiers of cell-to-cell communication in cancer. *Int J Mol Sci* 17:175
- Clark AR, Toker A (2014) Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer. *Biochem Soc Trans* 42:1349–1355
- Colombo M, Raposo G, Thery C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:255–289
- Desrochers LM, Bordeleau F, Reinhart-King CA, Cerione RA, Antonyak MA (2016) Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nat Commun* 7:11958
- Di J, Huang H, Qu D, Tang J, Cao W, Lu Z, Cheng Q, Yang J, Bai J, Zhang Y, Zheng J (2015) Rap2B promotes proliferation, migration, and invasion of human breast cancer through calcium-related ERK1/2 signaling pathway. *Sci Rep* 5:12363
- Dillon RL, White DE, Muller WJ (2007) The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 26:1338–1345
- Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273:20121–20127
- Espinosa-Neira R, Mejia-Rangel J, Cortes-Reynosa P, Salazar EP (2011) Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1782–1791
- Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, Martin A, Andres-Lacueva C, Senin U, Guralnik JM (2006) Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* 91:439–446
- Fritsche KL (2008) Too much linoleic acid promotes inflammation—doesn't it? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:173–175
- Galindo-Hernandez O, Serna-Marquez N, Castillo-Sanchez R, Salazar EP (2014) Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 91:299–310
- Galindo-Hernandez O, Gonzales-Vazquez C, Cortes-Reynosa P, Reyes-Urbe E, Chavez-Ocana S, Reyes-Hernandez O, Sierra-Martinez M, Salazar EP (2015) Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol* 36:9649–9659
- He M, Qin H, Poon TC, Sze SC, Ding X, Co NN, Ngai SM, Chan TF, Wong N (2015) Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis* 36:1008–1018
- Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004) MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117:4619–4628
- Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B, Pluchino S (2016) Focus on extracellular vesicles: physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int J Mol Sci* 17:171
- Irie HY, Pearlman RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS (2005) Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 171:1023–1034
- Kim EH, Willett WC, Colditz GA, Hankinson SE, Stampfer MJ, Hunter DJ, Rosner B, Holmes MD (2006) Dietary fat and risk of postmenopausal breast cancer in a 20-year follow-up. *Am J Epidemiol* 164:990–997
- Kowal J, Tkach M, Thery C (2014) Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 29:116–125
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8:627–644
- Matheny RW Jr, Adamo ML (2009) Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Exp Biol Med (Maywood)* 234:1264–1270
- Minciocchi VR, Freeman MR, Di Vizio D (2015) Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 40:41–51
- Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 123:1603–1611
- Mutschelknaus L, Azimzadeh O, Heider T, Winkler K, Vetter M, Kell R, Tapio S, Merl-Pham J, Huber SM, Edalat L, Radulovic V, Anastasov N, Atkinson MJ, Moertl S (2017) Radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells to promote migration of recipient cells. *Sci Rep* 7:12423
- Penforis P, Vallabhaneni KC, Whitt J, Pochampally R (2016) Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *Int J Cancer* 138:14–21
- Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, Teng YE, Zhang Y, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP (2009) Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis* 41:875–880
- Schulz M, Hoffmann K, Weikert C, Nothlings U, Schulze MB, Boeing H (2008) 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* 100:942–946
- Serna-Marquez N, Villegas-Comonfort S, Galindo-Hernandez O, Navarro-Tito N, Millan A, Salazar EP (2013) 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)* 36: 65–77
- Serna-Marquez N, Diaz-Aragon R, Reyes-Urbe E, Cortes-Reynosa P, Salazar EP (2017) Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Med Oncol* 34:111
- Simopoulos AP (2006) Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 60:502–507
- Soto-Guzman A, Navarro-Tito N, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R, Salazar EP (2010) Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 27:505–515
- Toker A (2012) Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Adv Biol Regul* 52:78–87
- Vanhaesebroeck B, Guillemet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:329–341
- Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489–501
- Webber J, Yeung V, Clayton A (2015) Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. *Semin Cell Dev Biol* 40:27–34
- Yang SX, Polley E, Lipkowitz S (2016) New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 45:87–96
- Yonezawa T, Katoh K, Obara Y (2004) Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun* 314:805–809
- Yonezawa T, Haga S, Kobayashi Y, Katoh K, Obara Y (2008) Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 367:729–735
- Yoon YJ, Kim DK, Yoon CM, Park J, Kim YK, Roh TY, Gho YS (2014) Egr-1 activation by cancer-derived extracellular vesicles promotes endothelial cell migration via ERK1/2 and JNK signaling pathways. *PLoS One* 9:e115170
- Zhao X, Guan JL (2011) Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 610–615





# Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with insulin-like growth factor 1 mediate an epithelial–mesenchymal transition process in MCF10A mammary epithelial cells

Elizabeth Leal-Orta<sup>1</sup> · Javier Ramirez-Ricardo<sup>1</sup> · Alejandra Garcia-Hernandez<sup>1</sup> · Pedro Cortes-Reynosa<sup>1</sup> · Eduardo Perez Salazar<sup>1</sup>

Received: 1 March 2021 / Accepted: 19 July 2021

© The International CCN Society 2021

## Abstract

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) plays an important role in function and development of the mammary gland. However, high levels of IGF-1 has been associated with an increased risk of breast cancer development. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a process where epithelial cells lose their epithelial characteristics and acquire a mesenchymal phenotype, which is considered one of the most important mechanisms in cancer initiation and promotion of metastasis. Extracellular vesicles (EVs) are released into the extracellular space by different cell types, which mediate intercellular communication and play an important role in different physiological and pathological processes, such as cancer. In this study, we demonstrate that EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with IGF-1 (IGF-1 EVs) decrease the levels of E-cadherin, increase the expression of vimentin and N-cadherin and stimulate the secretion of metalloproteinase-9 in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A. IGF-1 EVs also induce the expression of Snail1, Twist1 and Sip1, which are transcription factors involved in EMT. Moreover, IGF-1 EVs induce activation of ERK1/2, Akt1 and Akt2, migration and invasion. In summary, we demonstrate, for the first time, that IGF-1 EVs induce an EMT process in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A.

**Keywords** IGF-1 · Extracellular vesicles · EMT · MCF10A · MDA-MB-231 · ERK1/2 · Akt1/2

## Introduction

Breast cancer is the most frequent malignancy among females in developed countries and the leading cause of death related to cancer in women worldwide (Bray et al. 2018). Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive subtype of breast cancer that is defined by the lack of estrogen and progesterone receptors expression and the absence of HER2/neu overexpression and/or amplification (Godone et al. 2018; Wang et al. 2015). TNBC accounts for 10–15% of all breast cancer subtypes and has a higher frequency in younger premenopausal women with a higher rate of early recurrence, distant metastasis and a poorer prognosis (Duffy et al. 2012; Vagia et al. 2020).

Insulin-like growth factor (IGF) family comprises IGF-1, IGF-2, IGF-binding proteins (IGFBPs), and their respective receptors (Gallagher and LeRoith 2010; Hwa et al. 1999). IGFs are polypeptide hormones with a similar tertiary structure to insulin that are synthesized in the majority of body's tissues (Firth and Baxter 2002). IGF-1 is synthesized mainly in the liver via growth hormone and participates in development and function of the mammary gland, however high circulating levels of IGF-1 in healthy women has been linked to an increased risk of breast cancer development (Christopoulos et al. 2015; Firth and Baxter 2002). Biological effects mediated by IGF-1 are through binding and activation to type 1 IGF receptor (IGF-1R), which trigger intracellular signaling cascades including Shc, Grb2 and insulin receptor substrate (Gross and Yee 2003; Motallebnezhad et al. 2016). IGF-1R is overexpressed in a variety of cancers, including breast cancer, and the loss of tumor suppressor genes, such as *BRCA1*, *p53* and *PTEN*, promotes an increase of IGF-1R expression in tumors (Anisimov and Bartke 2013; Yakar et al. 2005). Moreover, IGF-1 has been implicated in malign

✉ Eduardo Perez Salazar  
eduardo.perez@cinvestav.mx

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN,  
07360 Mexico City, Mexico

transformation, due to its ability to maintain proliferation, cell survival, resistance to apoptosis, migration, invasion, angiogenesis, metastasis and an epithelial–mesenchymal transition (EMT) process via PI3K/Akt and Ras/Raf/ERK pathways (Christopoulos et al. 2015; Li et al. 2017; Mot-allebnezhad et al. 2016; Seccareccia and Brodt 2012; Zielinska et al. 2015).

EMT process involves the loss of cell–cell interactions and cell polarity, and the acquisition of mesenchymal properties including migration and invasion, which are regulated by several transcription factors, such as Fox2, Snail1/2, ZEB1/2 and Twist (Thiery et al. 2009). During EMT process occurs a decrease of epithelial markers expression, such as E-cadherin,  $\beta$ -catenin, desmoplakin, cytokeratin-8, cytokeratin-18, and an increase of mesenchymal markers expression including N-cadherin, vimentin, fibronectin, smooth muscle actin (SMA) and secretion of matrix metalloproteinases (MMPs) (Gavert and Ben-Ze'ev 2008; Li et al. 2017; Lu and Kang 2019). EMT process mediates tumor progression, because during invasion and metastasis the cancer cells acquire the ability to migrate, secrete MMPs, degrade basement membrane and invade surrounding tissues (Lu and Kang 2019; Zielinska et al. 2015).

Extracellular vesicles (EVs) are secreted into the extracellular space by different cell types under normal and pathological conditions, and exert their action at short and long distances, providing an alternative mode of intercellular communication (Kalra et al. 2016; Turturici et al. 2014; Vader et al. 2014). EVs are classified into three types according to their biogenesis and size: exosomes (30–100 nm) are a homogeneous group of vesicles with an endocytic origin; microvesicles (100–1000 nm) are a heterogeneous group of vesicles generated directly from plasma membrane; and apoptotic bodies (1–5  $\mu$ m) derived from apoptotic cells (Colombo et al. 2014; Kalra et al. 2016; Raposo and Stoorvogel 2013). Moreover, EVs mediate a variety of cellular functions in their target cells, which are dependent on cell type of origin and their composition, because these vesicles contain a variety of cargo molecules, including proteins, mRNA, microRNA, lncRNA and lipids (Colombo et al. 2014; Kalra et al. 2016; Raposo and Stoorvogel 2013). In cancer, EVs are crucial in the maintenance and acquisition of cancer-associated hallmarks, because they are able to mediate evasion of growth suppressors, sustained proliferative signaling, evasion of apoptosis and immune destruction, migration, invasion, angiogenesis and EMT (Greening et al. 2015; Kanada et al. 2016; Vader et al. 2014). However, the role of EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with IGF-1 in the EMT process is still not studied.

In this study, we demonstrate that EVs released from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with IGF-1 promote a decrease of E-cadherin expression, which is accompanied with an increase of N-cadherin, vimentin and

E-cadherin transcriptional repressors (Snail1, Twist1 and Sip1) expression in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A. Moreover, EVs also induce activation of ERK1/2, Akt1 and Akt2, as well as an increase of MMP-9 secretion, migration and invasion.

## Materials and methods

### Antibodies and reagents

IGF-1, epidermal growth factor (EGF), A6730 and tetramethylrhodamine (TRITC)-conjugated phalloidin were from Sigma-Aldrich (Merck KGaA). Hoechst dye, CD9 C-4 antibody (Ab), E-cadherin 67A4 Ab, vimentin V9 Ab, N-cadherin 13A9 Ab, Akt1 B-1 Ab and Akt2 F-7 Ab were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Flotillin-2 (Flot-2) Ab and basement membrane matrix (BD Matrigel) were from BD Biosciences (Bedford, MA). CD63 MEM-259 Ab was from Abcam (Cambridge, MA). ERK1/2 inhibitor (3-(2-aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4 thiazolidinedione hydrochloride, HCl) was from Merck Millipore (Rockland, MA). ERK1/2 Ab and phosphospecific Abs to threonine (Thr)-202 and tyrosine (Tyr)-204 of ERK1/2 (anti-p-ERK1/2), and to serine (Ser)-473 and Ser-474 of Akt1 and Akt2 respectively (anti-p-Akt Ab) were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). CellMask™ Orange plasma membrane stain was from ThermoFisher Scientific. Actin Ab was kindly provided by Dr. Jose-Manuel Hernandez (Cinvestav-IPN).

### Cell lines and culture

The TNBC MDA-MB-231 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 3.7 g/l sodium bicarbonate, 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Human mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A were cultured in DMEM/F12 medium (3:1) supplemented with 10% FBS, 0.5  $\mu$ g/ml hydrocortisone, 20 ng/ml EGF, 10  $\mu$ g/ml insulin and antibiotics. Cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C. MDA-MB-231 cells were FBS-starved in DMEM for 24 h before stimulation with IGF-1, while MCF10A cells were FBS-starved in DMEM/F12 without hydrocortisone, EGF and insulin for 18 h before treatment with inhibitors and/or EVs.

### Stimulation of MDA-MB-231 cells with IGF-1

Cultures of MDA-MB-231 cells ( $8 \times 10^6$  cells/100-mm culture plate) were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and stimulated with 10 nM IGF-1 in DMEM

for 48 h at 37 °C. After incubation, conditioned media were collected and EV fractions were obtained (Fig. S1).

### Isolation of EVs

Conditioned media were centrifuged twice at 600 × g for 10 min at 4 °C. Supernatants were carefully aspirated and then sequentially centrifuged twice at 2000 × g for 15 min, once at 10,000 × g for 30 min and once at 110,000 × g for 70 min at 4 °C. Supernatants were aspirated and pellets were reconstituted in PBS or FBS-free DMEM (EV fractions). Protein concentration of EV fractions was determined by the micro-Bradford protein assay (Bio-Rad, USA).

### Stimulation of MCF10A cells with EV fractions

Cultures of MCF10A cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/35-mm culture plate) were washed twice with PBS and treated for different times with EV fractions from MDA-MB-231 cells unstimulated or stimulated with 10 nM IGF-1 for 48 h (80 µg EVs/experimental condition) in FBS-free DMEM/F12 (Fig. S1). After stimulation, media were collected and cells were solubilized in 0.5 ml of ice-cold RIPA buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% SDS and 1 mM PMSF). Protein concentration of samples was determined by the micro-Bradford protein assay (Bio-Rad, USA).

### Transmission electron microscopy (TEM)

One fraction of EVs (80 µg EVs) was suspended in 100 µl PBS, and then an aliquot (30 µl) was adsorbed on carbon-coated copper grids with mesh formvar (0.3%) for 5 min at room temperature. Grids were negatively stained for 30 s with 2% uranyl acetate at room temperature, and excess fluid was removed using filter paper. Grids were air-dried and analyzed using a JEM-1400 transmission electron microscope (JEOL, Japan) operated at 80 kV and coupled with a digital camera Veleta (Olympus SIS, Germany).

### Western blot (WB) analysis

Equal amounts of protein were separated using 10% SDS-PAGE separating gels followed by transfer to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 2 h at room temperature using 5% non-fat dried milk in PBS pH 7.2/0.1% Tween 20 (wash buffer), and incubated overnight at 4 °C with primary Ab. Membranes were washed three times with wash buffer and incubated with secondary Ab conjugated to horseradish peroxidase for 2 h at room temperature. After washing three times with wash buffer, the immunoreactive bands were visualized using WB luminol reagent and exposition to an autoradiography film. For quantification, autoradiograms were scanned and bands were analyzed using the ImageJ software v 1.52e (NIH, USA).

### Immunoprecipitation (IP)

Lysates were clarified by centrifugation at 13,500 × g for 10 min at 4 °C. Supernatants were transferred to fresh tubes and equal amounts of protein were immunoprecipitated overnight at 4 °C with protein A-agarose linked to anti-Akt1 Ab or anti-Akt2 Ab. Immunoprecipitates were washed three times with RIPA buffer and proteins were extracted with SDS-PAGE sample buffer by boiling for 5 min and resolved by SDS-PAGE and analyzed by WB.

### Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was obtained by using TRIzol reagent (Invitrogen). cDNA was synthesized using SuperScript III reverse transcription system and 1 µg of total RNA as template. For real-time PCR, relative gene expression was determined by using the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA). Primers are shown in Table 1, and amplification was performed by 45 cycles of sequential denaturation (95 °C, 2 min), annealing (60 °C, 15 s) and extension (72 °C, 20 s). Results were analyzed by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and normalized to β-actin data.

**Table 1** Forward and reverse primer sequences used for real-time quantitative polymerase chain reaction

Gene	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
<i>Snail</i>	GCGAGCTGCAGGACTCTAAT	CCTCTGTCTCATCTGACA
<i>Twist1</i>	GGAGTCCGCAGTCTTACGAG	TGGAGGACCTGGTAGAGGAA
<i>Sip1</i>	AATGGCAACAGCAACAAGTG	CCCCGTCAGCACATAACTTT
<i>E-cadherin</i>	CGACCAACCCAAGAATCTA	AGGCTGTGCCTTCCTACAGA
<i>Vimentin</i>	GGTACTCAGTGGACTCCTGCTTT	CTGCCAACCGGAACAATGA
<i>β-actin</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

## Scratch-wound assays

Cultures of MCF10A cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/35-mm culture plate) were treated for 2 h with 12  $\mu$ M mitomycin C to inhibit proliferation during the experiment. Cell cultures were scratched, washed twice with PBS and supplemented with FBS-free DMEM/F12 with or without inhibitors and/or EV fractions (80  $\mu$ g EVs/experimental condition) for 48 h at 37 °C. Cultures were photographed using an inverted microscope coupled to a camera (FSX100; Olympus Corporation). Images from  $\geq 3$  fields per experimental condition were acquired and analyzed using the ImageJ software v 1.52e (NIH, USA).

## Zymography

Conditioned media were concentrated using 5000 Da Centricon® filters (EDM Millipore). Equal volumes of non-heated conditioned medium and sample buffer (2.5% SDS, 2% sucrose, 4  $\mu$ g/ml phenol red) were mixed and loaded into 8% polyacrylamide gels copolymerized with gelatin (1 mg/ml). Gels were rinsed twice for 30 min with 2.5% Triton X-100, and incubated in assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) for 48 h at 37 °C. After incubation, gels were fixed and stained with a solution of Coomassie Brilliant Blue G-250 (0.25%) dissolved in acetic acid (10%) and methanol (30%). Proteolytic activity was identified as clear bands on a blue background. Controls of MMP-2 and MMP-9 secretions were included, which were prepared by treatment of MDA-MB-231 cells with 400 mg/dl ethanol and 100 ng/ml PDB for 24 h at 37 °C respectively (Ke et al. 2006; Park et al. 2000).

## Invasion assays

Inserts of 24-well plates (Costar; Corning, Inc) were covered with 50  $\mu$ l Matrigel (3 mg/ml) and incubated overnight at 37 °C. Next, MCF10A cells ( $1 \times 10^5$ ) were plated on Matrigel of each insert (Upper chamber) in fresh FBS-free DMEM/F12. Lower chamber contained 600  $\mu$ l EV fractions dissolved in FBS-free DMEM/F12 (80  $\mu$ g EVs/experimental condition). Plates were incubated for 72 h at 37 °C under a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  and 95% air. After incubation, cells and Matrigel on the upper surface of membranes were removed with cotton swabs, and the cells on the lower surface of the membranes were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde (4%) for 12 min at room temperature. Invaded cells were imaged using an inverted microscope coupled to a camera (FSX100; Olympus Corporation). Quantification of invaded cells was determined by staining of membranes

with crystal violet (0.5%) in PBS for 15 min at room temperature and elution of dye with 300  $\mu$ l of acetic acid (10%). Absorbance of collected solution was measured at 600 nm.

## Immunofluorescence confocal microscopy

MCF10A cells were grown on chamber slides (Nunc Lab-Tek® II), washed with PBS, equilibrated in DMEM and treated for 2 h with 12  $\mu$ M mitomycin C. Cultures were scratched, washed with DMEM and treated with EVs (80  $\mu$ g EVs/experimental condition) for 48 h at 37 °C. After incubation, cells were fixed with paraformaldehyde (4%) for 20 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 20 min and blocked with 10% FBS for 30 min at room temperature. Cells were incubated for 12 h at 4 °C with anti-vimentin Ab (1:100) followed by FITC-labeled anti-mouse secondary Ab for 2 h at 4 °C. Staining of fibrillar actin was performed by incubation of cells for 1 h at room temperature with TRITC-conjugated phalloidin, and cells were counterstained with Hoechst for 20 min at room temperature and mounted on glass slides using Vectashield. Cells were analyzed by confocal microscopy (Model TCS SP2; Leica Microsystems, Inc). Images were analyzed by using the ImageJ software v 1.52e (NIH, USA).

## EV uptake assays using confocal microscopy

EV fractions (80  $\mu$ g EVs/experimental condition) were stained with CellMask™ Orange plasma membrane stain (2.5  $\mu$ g/ml) for 30 min at 4 °C, and then washed with PBS and centrifuged at  $110,000 \times g$  for 70 min at 4 °C. EVs were reconstituted in 100  $\mu$ l FBS-free DMEM. MCF10A cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/experimental condition) were incubated for 20 min at 37 °C with unstained EVs and stained EVs. After incubation, cells were washed twice with PBS, fixed for 20 min with paraformaldehyde (4%) at room temperature and washed twice with PBS. Next, cells were counterstained with Hoechst for 20 min at room temperature and mounted on glass slides using Vectashield. Preparations were analyzed by confocal microscopy (Model TCS SP2; Leica Microsystems, Inc). Images were analyzed by using the ImageJ software v 1.52e (NIH, USA).

## Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments, and were analyzed using one-way ANOVA and Turkey's multiple comparison test. Statistical probability of  $P < 0.05$  was considered significant.

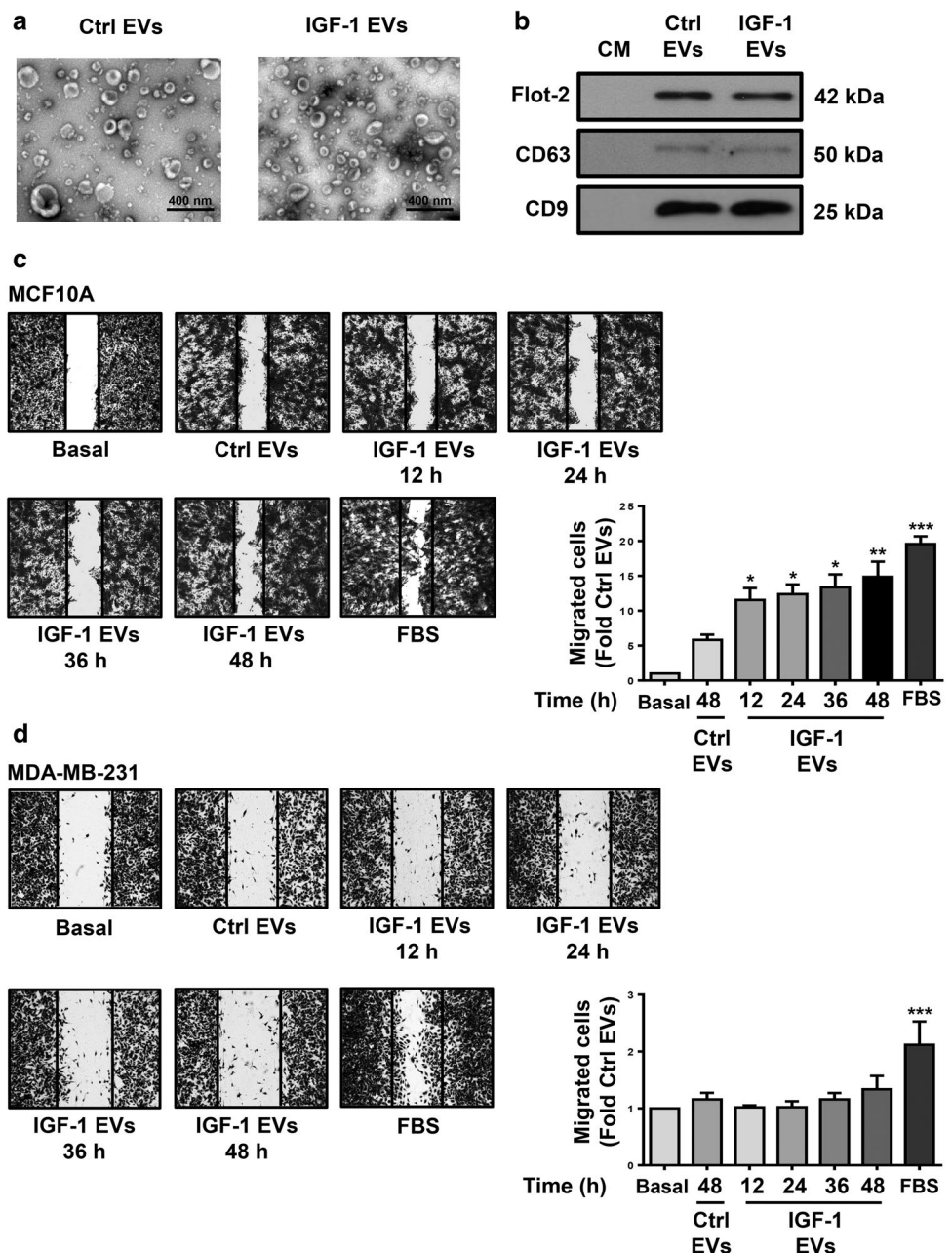
## Results

### Characterization of EVs from MDA-MB-231 cells unstimulated and stimulated with IGF-1

First, we determined that stimulation of MDA-MB-231 breast cancer cells with 10–50 nM IGF-1 induced maximal migration (Fig. S2). Therefore, we studied whether EVs released from MDA-MB-231 cells stimulated with 10 nM IGF-1 induced an EMT process in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A.

EV fractions from MDA-MB-231 cells incubated with FBS-free DMEM for 48 h (Ctrl EVs) and EV fractions from MDA-MB-231 cells stimulated with 10 nM IGF-1 for 48 h (IGF-1 EVs) were characterized by TEM and WB with Abs against Flot-2, CD63 and CD9, because these proteins are molecular markers associated with EVs (Raposo and Stoorvogel 2013). TEM demonstrated the presence of vesicles with sizes between 50 and 500 nm, and WB showed the presence of Flot-2, CD63 and CD9 in Ctrl EVs and IGF-1 EVs (Fig. 1a, b).

**Fig. 1** IGF-1 EVs induce migration in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A. **a** and **b** Ctrl EVs and IGF-1 EVs were analyzed by TEM and WB with anti-Flot-2 Ab, anti-CD63 Ab and anti-CD9 Ab. One control of culture medium depleted of EVs was included (CM). **c** and **d** Migration assays were performed with MCF10A and MDA-MB-231 cells treated with Ctrl EVs and EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with 10 nM IGF-1 for 12, 24, 36 and 48 h. One control of MCF10A and MDA-MB-231 cells without treatment with EVs (Basal) and a control of migration (FBS) were included. Graphs represent the mean  $\pm$  SD and indicate the fold of migration above Ctrl EVs value. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001



## EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with IGF-1 induce migration in MCF10A cells

In order to determine whether EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with IGF-1 for different periods of time induced migration in MCF10A cells, migration assays were performed with MCF10A cells treated for 48 h with Ctrl EVs and EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with 10 nM IGF-1 for 12, 24, 36 and 48 h (Fig. S3). Results demonstrated that EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with 10 nM IGF-1 for 12–48 h induced migration, whereas treatment with Ctrl EVs did not induce migration in MCF10A cells (Fig. 1c). Therefore, our experiments were performed with EV fractions from MDA-MB-231 cells stimulated with 10 nM IGF-1 for 48 h.

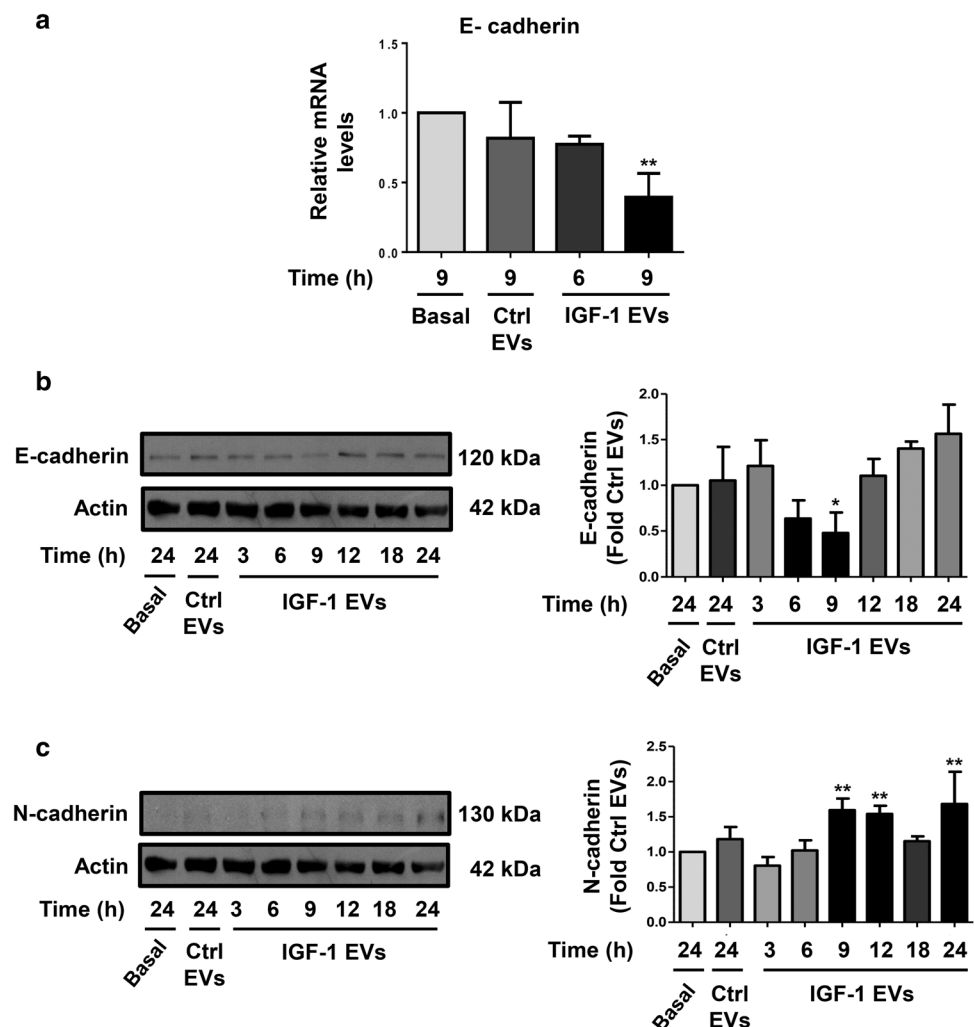
Next, we determined whether EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with IGF-1 for different periods of time induced migration in MDA-MB-231 cells. Migration assays were performed with MDA-MB-231 cells treated with Ctrl EVs and EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with

10 nM IGF-1 for 12, 24, 36 and 48 h (Fig. S3). Results demonstrated that EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with 10 nM IGF-1 for 12–48 h did not induce migration in MDA-MB-231 cells (Fig. 1d).

## IGF-1 EVs regulate E-cadherin and N-cadherin expression

We determined whether IGF-1 EVs induced downregulation of E-cadherin expression and an increase of N-cadherin expression in MCF10A cells. Cultures of MCF10A cells were treated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs for various periods of time and then total RNA and cell lysates were obtained. E-cadherin transcripts were analyzed by RT-qPCR and cell lysates were analyzed by WB with anti-E-cadherin Ab and anti-N-cadherin Ab. Findings showed that IGF-1 EVs induced downregulation of E-cadherin transcripts at 9 h of treatment in MCF10A cells (Fig. 2a). Moreover, IGF-1 EVs induced a transient downregulation of E-cadherin expression at 9 h of treatment, and an increase of N-cadherin

**Fig. 2** IGF-1 EVs regulate expression of E- and N-cadherin. MCF10A cells were treated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs and then total RNA or cell lysates were obtained. **a** E-cadherin transcripts were analyzed by RT-qPCR. **b** and **c** Cell lysates were analyzed by WB with anti-E-cadherin Ab, anti-N-cadherin Ab and anti-actin Ab. One control of MCF10A cells without treatment with EVs was included (Basal). Graphs represent the mean  $\pm$  SD and indicate the fold of E-cadherin and N-cadherin above Ctrl EVs value. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$



expression at 9, 12 and 24 h of treatment in MCF10A cells (Fig. 2b, c). In contrast, Ctrl EVs did not induce downregulation of E-cadherin or an increase of N-cadherin expression at 9, 12 and 18 h of treatment in MCF10A cells (Fig. S4).

### IGF-1 EVs induce an increase of E-cadherin transcriptional repressors

Transcripts of Snail1, Twist1 and Sip1, which are E-cadherin transcriptional repressors, were analyzed by RT-qPCR using total RNA from MCF10A cells treated for 6 and/or 9 h with Ctrl EVs and IGF-1 EVs. Findings showed that treatment of MCF10A cells with IGF-1 EVs induced an increase of Snail1 transcripts at 6 and 9 h of treatment, and an increase of Twist1 and Sip1 transcripts at 6 h of treatment (Fig. 3a–c).

### IGF-1 EVs enhance vimentin expression

To determine whether treatment with IGF-1 EVs induced an increase of vimentin expression, cultures of MCF10A cells were treated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs for various periods of time and then total RNA and cell lysates were obtained. Vimentin expression was analyzed by RT-qPCR and WB with anti-vimentin Ab. Results showed that IGF-1

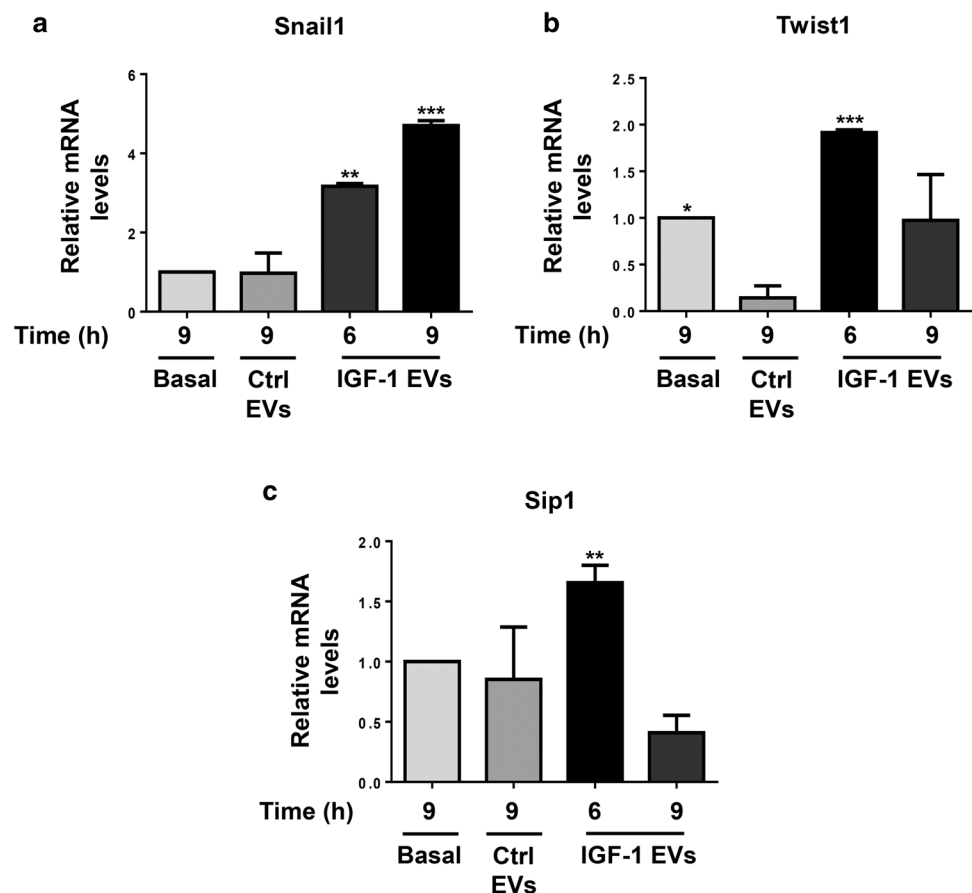
EVs induced an increase of vimentin transcripts at 6 h and an increase of vimentin expression at 9, 12 and 24 h of treatment in MCF10A cells (Fig. 4a, b).

To further substantiate our findings, we studied vimentin expression by using confocal microscopy in scratch-wound assays of MCF10A cells treated for 48 h with Ctrl EVs and IGF-1 EVs. As illustrated in Fig. 4c, MCF10A cells treated with Ctrl EVs had a little bit of vimentin expression, however treatment with IGF-1 EVs remarkably induced an increase of vimentin expression, and it was mainly localized in migrating cells.

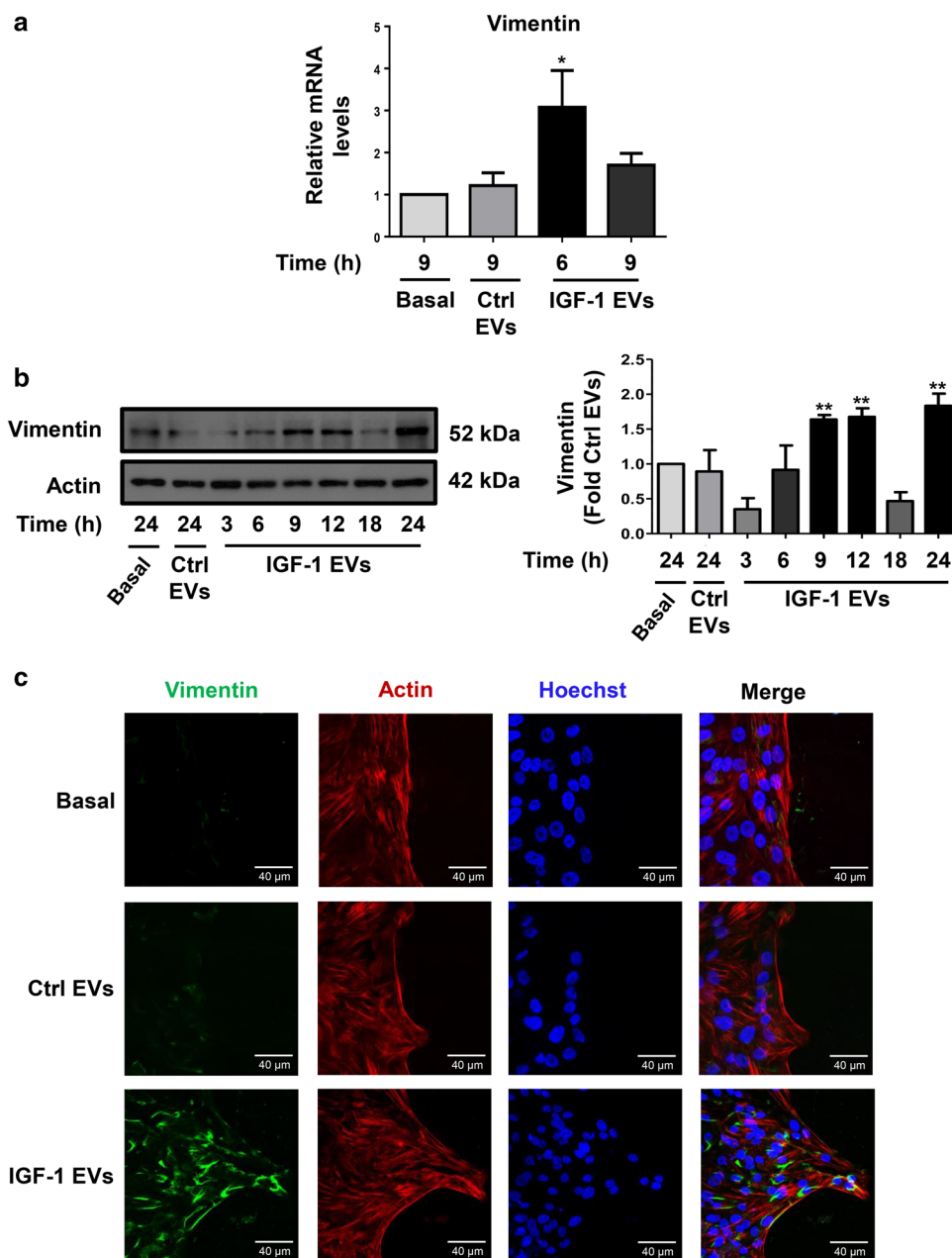
### IGF-1 EVs induce an increase of MMP-9 secretion and invasion

To determine whether treatment with IGF-1 EVs induced an increase of MMP-2 and MMP-9 secretion, MCF10A cells were treated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs, and then conditioned media were obtained and cells were lysed. MMP-2 and MMP-9 secretion was analyzed by gelatin zymography of conditioned media, and cell lysates were analyzed by WB with anti-actin Ab. Findings showed that IGF-1 EVs only induced an increase of MMP-9 secretion at 24 h of treatment in MCF10A cells. WB of cell

**Fig. 3** IGF-1 EVs induce an increase of E-cadherin transcriptional repressors. **a–c** MCF10A cells were treated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs and then total RNA was obtained. One control of MCF10A cells without treatment with EVs was included (Basal). Snail1, Twist1 and Sip1 transcripts were analyzed by RT-qPCR. Comparisons were made to cells treated with Ctrl EVs. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$



**Fig. 4** IGF-1 EVs induce an increase of vimentin expression. MCF10A cells were treated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs and then total RNA or cell lysates were obtained. **a** Vimentin transcripts were analyzed by RT-qPCR. Comparisons were made to cells treated with Ctrl EVs. **b** Cell lysates were analyzed by WB with anti-vimentin Ab and anti-actin Ab. Graph represents the mean  $\pm$  SD and indicate the fold of vimentin above Ctrl EVs value. **c** MCF10A cells cultured on coverslips were stimulated for 48 h with Ctrl EVs and IGF-1 EVs. Cells were stained with anti-vimentin Ab, TRITC-conjugated phalloidin and nucleus were stained with Hoechst dye. Cells were analyzed by confocal microscopy. One control of MCF10A cells without treatment with EVs was included (Basal). Scale bar 40  $\mu$ m. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01



lysates with anti-actin Ab confirmed that similar number of MCF10A cells was stimulated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs (Fig. 5a).

Invasion assays were performed using MCF10A cells treated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs for 72 h. As illustrated in Fig. 5b, treatment with IGF-1 EVs induced invasion in MCF10A cells.

### IGF-1 EVs induce migration via ERK1/2

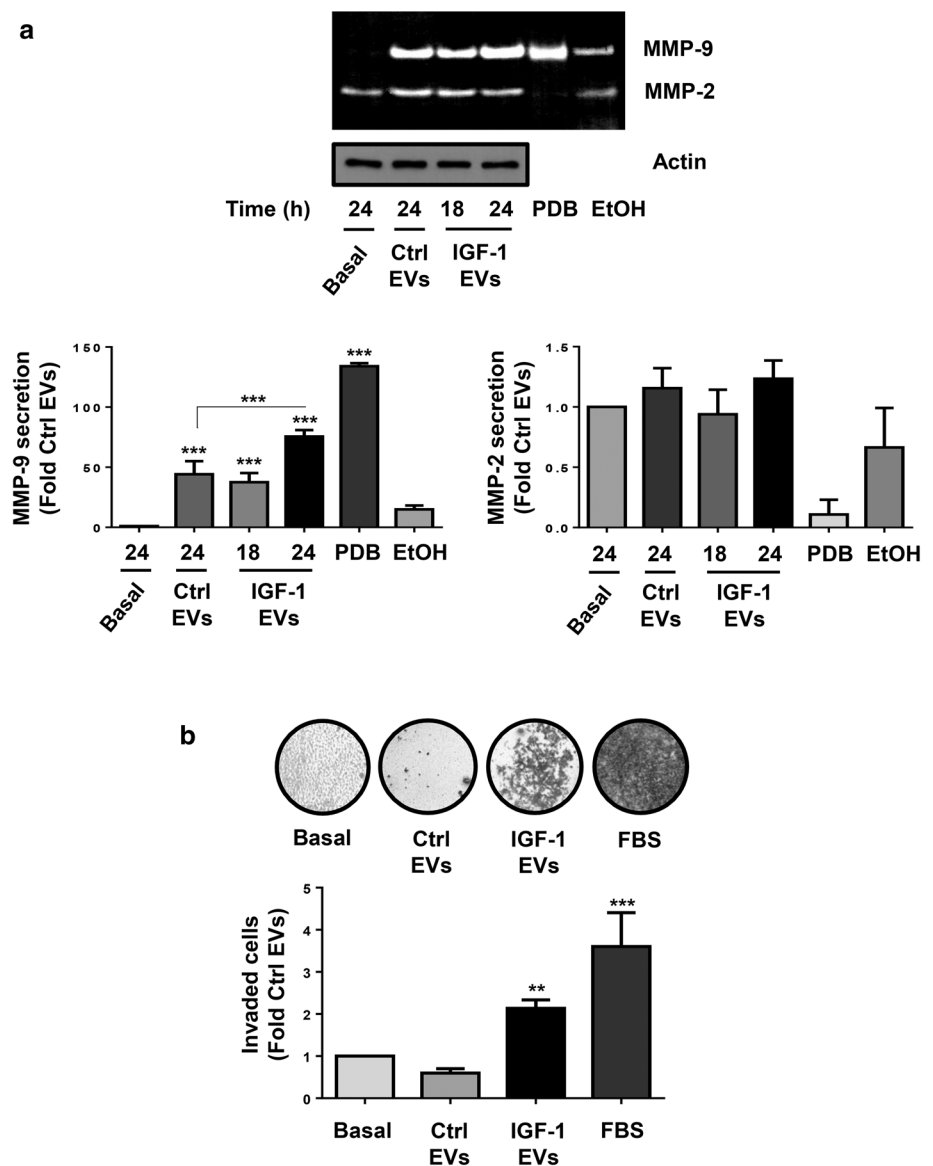
We determined whether IGF-1 EVs induced ERK1/2 activation, which is mediated by their phosphorylation at Thr-202 and Tyr-204 (p-ERK1/2) (Guo et al. 2020). MCF10A cells

were treated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs and lysed. Cell lysates were analyzed by WB with anti-p-ERK1/2 Ab. Findings showed that IGF-1 EVs induced an increase of ERK1/2 phosphorylation at Thr-202 and Tyr-204, reaching a maximum at 20 min of treatment (Fig. 6a).

To determine the role of ERK1/2 in cell migration induced by IGF-1 EVs, migration assays were performed using MCF10A cells pretreated with 50 nM ERK1/2 inhibitor for 1 h and then treated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs for 48 h. Findings showed that treatment with ERK1/2 inhibitor completely inhibited migration induced by IGF-1 EVs in MCF10A cells (Fig. 6b).



**Fig. 5** IGF-1 EVs induce an increase of MMP-9 secretion and invasion. **a** MCF10A cells were treated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs and then conditioned media were obtained. MMP-2 and MMP-9 secretion was analyzed by gelatin-substrate gels. Positive controls of MMP-2 (EtOH) and MMP-9 (PDB) secretion were included. One control of MCF10A cells without treatment with EVs was included (Basal). Graph represents the mean  $\pm$  SD and indicate the fold of MMP-2 and MMP-9 secretion above Ctrl EVs value. Comparisons were made to cells treated with Ctrl EVs and basal values as indicated. **b** Invasion assays were performed with MCF10A cells treated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs for 72 h. One control of MCF10A cells without treatment with EVs (Basal) and a control of invasion (FBS) were included. Graph represents the mean  $\pm$  SD and indicate the fold of invasion above Ctrl EVs value.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$



### IGF-1 EVs induce migration via Akt activity

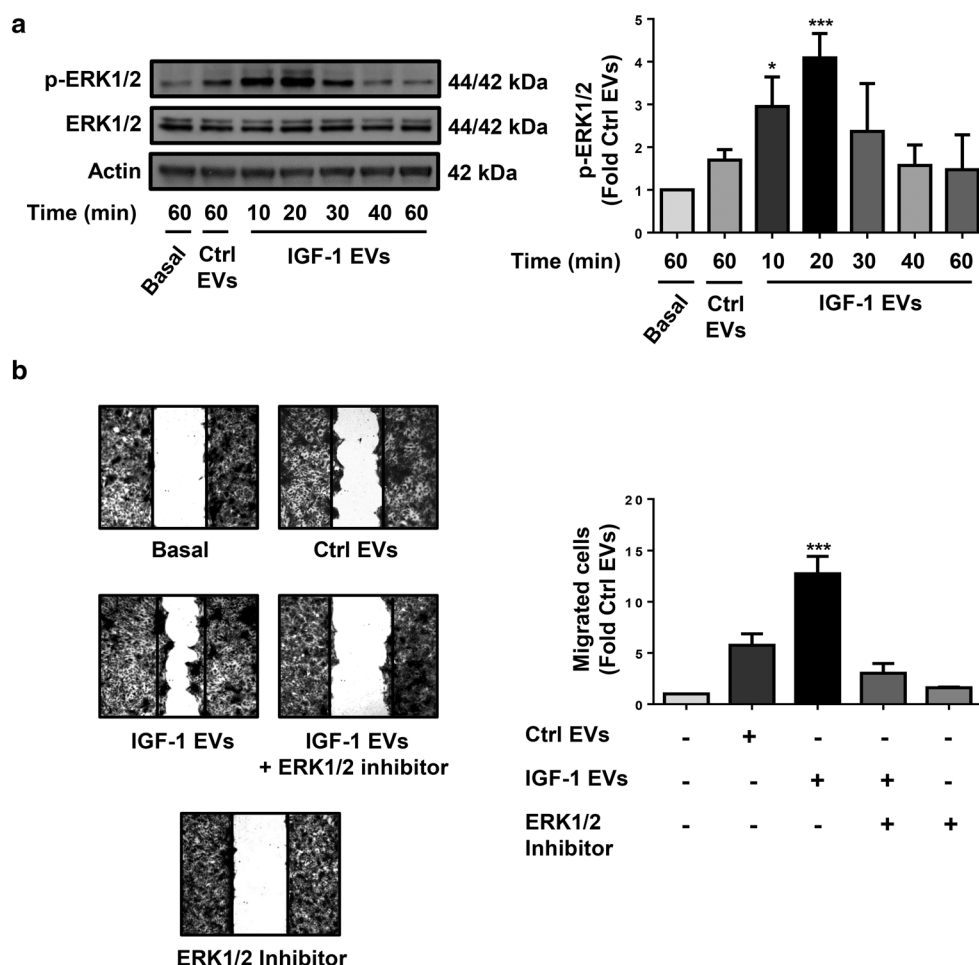
To determine whether IGF-1 EVs induced Akt1 and Akt2 activation, which is mediated by their phosphorylation at Ser-473 (p-Akt1) and Ser-474 (p-Akt2) of Akt1 and Akt2 respectively (Dillon et al. 2009), lysates from MCF10A cells stimulated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs were analyzed by IP with anti-Akt1 Ab and anti-Akt2 Ab, followed by WB with anti-p-Akt Ab. Findings showed that IGF-1 EVs induced an increase of phosphorylation of Akt1 at Ser-473 and Akt2 at Ser-474 in MCF10A cells, reaching a maximum at 20 min of treatment (Fig. 7a, b).

To determine the role of Akt1/2 in cell migration induced by IGF-1 EVs, migration assays were performed with MCF10A cells pretreated with 2  $\mu$ M A6730 (Akt1/2

inhibitor) for 1 h, and then treated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs for 48 h. As illustrated in Fig. 7c, treatment with A6730 completely inhibited the migration induced by IGF-1 EVs in MCF10A cells.

### Ctrl EVs and IGF-1 EVs are taken up by MCF10A cells

To determine whether Ctrl EVs and IGF-1 EVs were taken up by MCF10A cells, Ctrl EVs and IGF-1 EVs were stained using CellMask™ orange dye. Next, MCF10A cells were treated with unstained IGF-1 EVs, stained Ctrl EVs and stained IGF-1 EVs for 20 min, and then cells were analyzed by confocal microscopy. Findings showed that MCF10A cells treated with stained Ctrl EVs and stained IGF-1 EVs had a red staining and it was higher compared with cells treated with unstained IGF-1 EVs. Analysis of



**Fig. 6** IGF-1 EVs induce migration via ERK1/2 activity. **a** MCF10A cells were treated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs and lysed. Cell lysates were analyzed by WB with anti-p-ERK1/2 Ab, anti-ERK1/2 Ab and anti-actin Ab. **b** Migration assays were performed with MCF10A cells pretreated for 1 h with

50 nM ERK1/2 inhibitor and treated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs for 48 h. One control of MCF10A cells without treatment with EVs was included (Basal). Graphs represent the mean  $\pm$  SD and indicate the fold of p-ERK1/2 and migration above Ctrl EVs value. \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001

fluorescence values between stained Ctrl EVs and stained IGF-1 EVs demonstrated that there is not a significant difference between these values. Moreover, the role of Akt1/2 and ERK1/2 activity in the uptake of IGF-1 EVs was studied. MCF10A cells were pretreated with A6730 and ERK1/2 inhibitor and then treated with stained IGF-1 EVs. Results demonstrated that inhibition of ERK1/2 and Akt1/2 activity did not inhibit the uptake of IGF-1 EVs in MCF10A cells (Fig. 8).

## Discussion

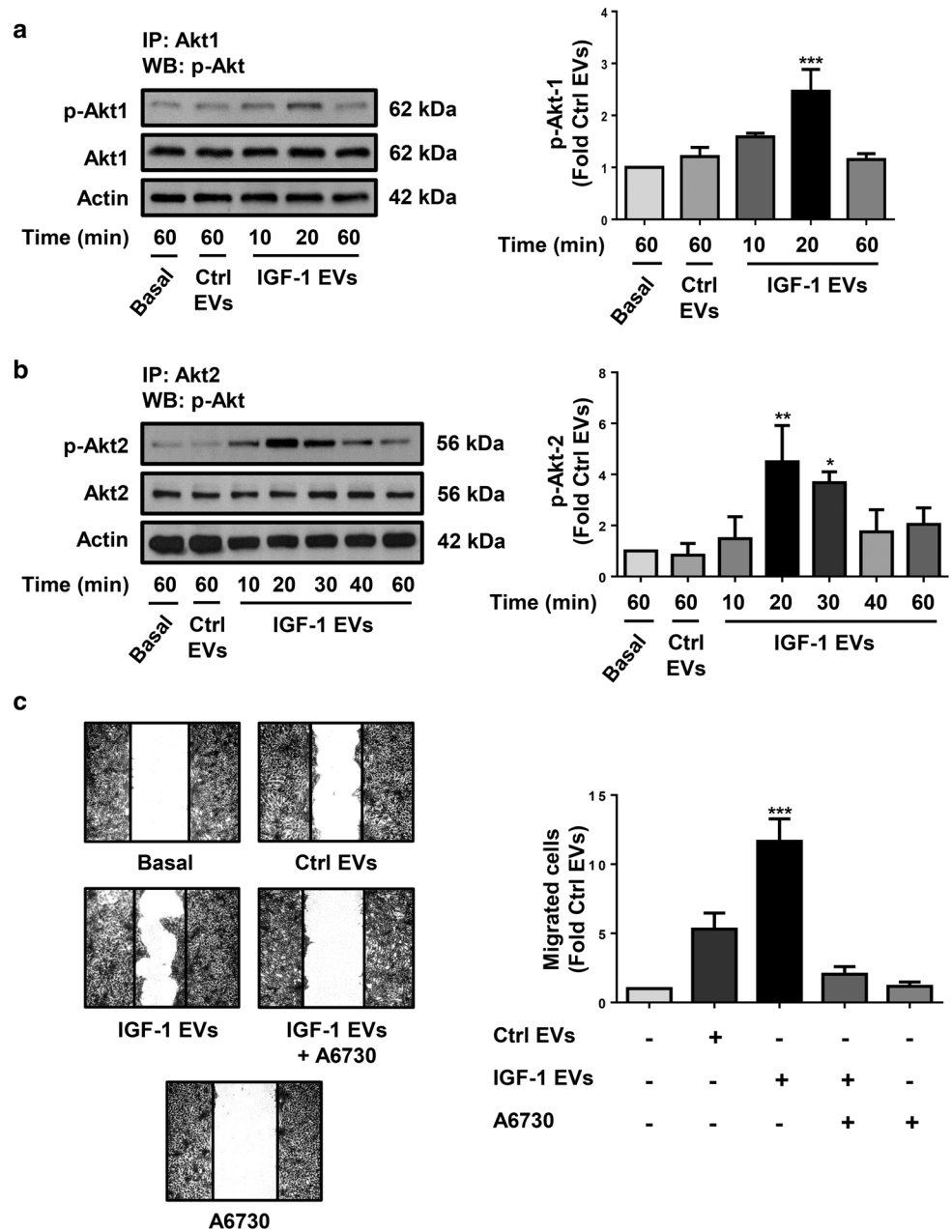
IGF system contributes to progression and development of breast cancer through a variety of mechanisms, including overexpression of IGF-1 and IGF-2, changes in the expression of IGF receptors and reduction of circulating IGF-BPs

levels (Farabaugh et al. 2015; Motallebnezhad et al. 2016). Moreover, IGF-1R is overexpressed in breast cancer, and its expression has been related with an aggressive phenotype, poor clinical outcome and therapy resistance (Christopoulos et al. 2015; Jones et al. 2007; Papa et al. 1993). However, the role of EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with IGF-1 in the EMT process has not been studied.

In this study, TEM demonstrate that we isolated a heterogeneous population of EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells unstimulated and stimulated with IGF-1, while WB demonstrate the presence of specific markers of EVs. We hypothesize that Ctrl EVs and IGF-1 EVs have a variety of specific cargos, and that only IGF-1 EVs are able to induce cellular processes involved in the EMT in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A.

Metastasis is mediated by the EMT, because during EMT process the epithelial tumor cells acquire the ability

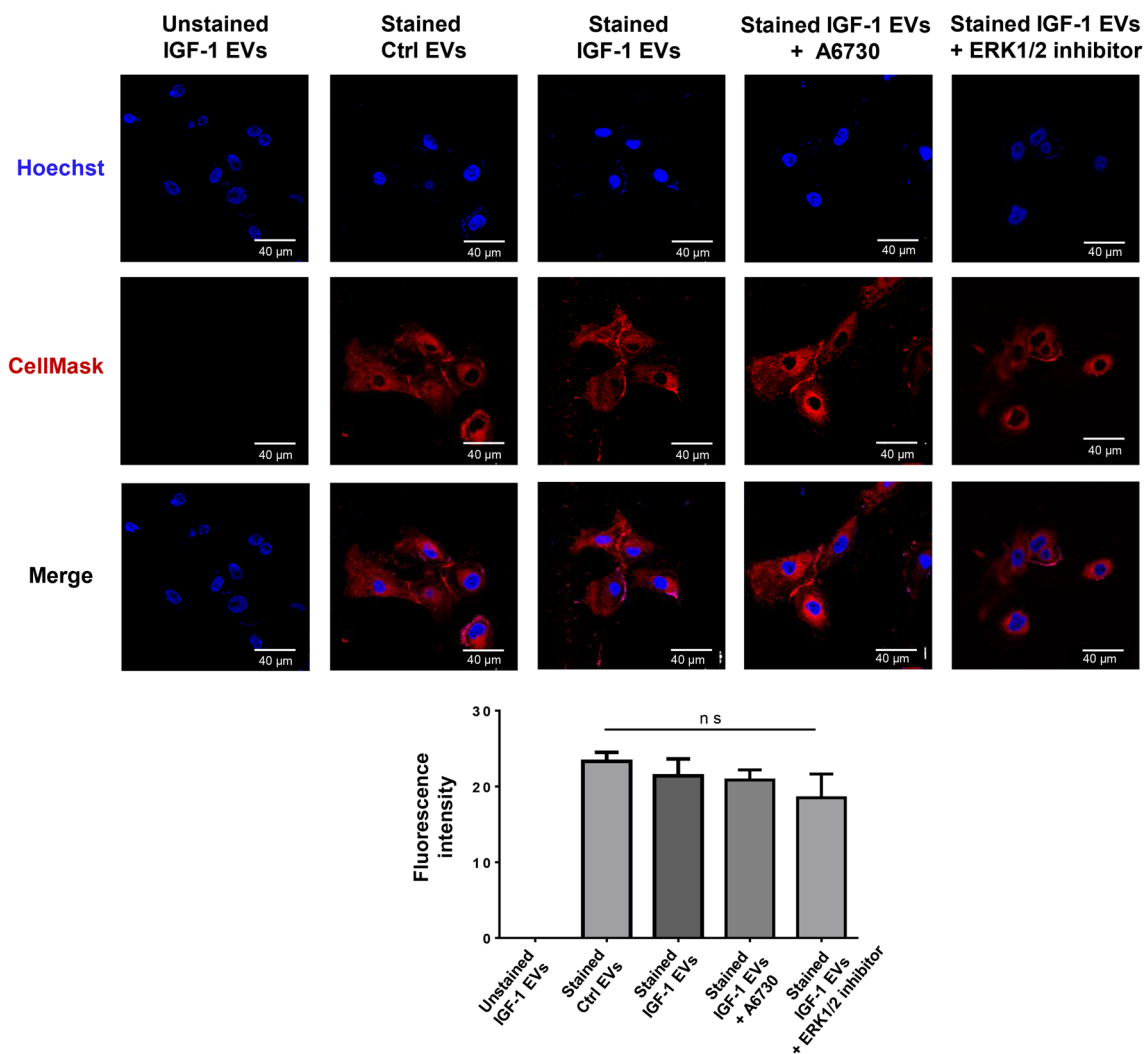
**Fig. 7** IGF-1 EVs induce migration via Akt1/2 activity. **a** and **b** MCF10A cells were treated for various periods of time with Ctrl EVs and IGF-1 EVs and lysed. Cell lysates were analyzed by IP with anti-Akt1 Ab and anti-Akt2 Ab followed by WB with anti-p-Akt Ab. Membranes were reprobed with anti-Akt1 Ab and anti-Akt2 Ab. Cell lysates were also analyzed by WB with anti-actin Ab. **c** Migration assays were performed with MCF10A cells pretreated for 1 h with 2  $\mu$ M A6730 and treated with Ctrl EVs and IGF-1 EVs for 48 h. One control of MCF10A cells without treatment with EVs was included (Basal). Graphs represent the mean  $\pm$  SD and indicate the fold of p-Akt1, p-Akt2 and migration above Ctrl EVs value. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001



to migrate and invade the surrounding tissues (Thiery et al. 2009). We demonstrate that IGF-1 EVs induce migration in MCF10A cells. However, IGF-1 EVs do not induce migration in MDA-MB-231 cells, whereas IGF-1 induces migration in MDA-MB-231 cells. Our findings demonstrate that IGF-1 EVs are not able to mediate migration via an auto-crine and/or paracrine mechanism in MDA-MB-231 cells. We propose that stimulation of MDA-MB-231 cells with IGF-1 mediates specific changes in the cargo of secreted EVs compared with EVs released from unstimulated MDA-MB-231 cells (Ctrl EVs), and then IGF-1 EVs are able to induce activation of signal transduction pathways that mediate migration in MCF10A cells. In contrast, cargos in IGF-1

EVs are not able to activate signal transduction pathways that mediate migration in MDA-MB-231 cells. Supporting our proposal, stimulation of MDA-MB-231 cells with linoleic acid (LA) releases EVs that mediate cellular processes involved with angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), whereas EVs released from unstimulated MDA-MB-231 cells are not able to mediate these cellular processes (Garcia-Hernandez et al. 2020).

EMT process requires that non-motile epithelial cells acquire motile and invasive properties through the disassembly of adherens junctions (Thiery et al. 2009). Particularly, disassembly of adherens junctions involves the loss or reduction of E-cadherin expression and the cytoskeleton



**Fig. 8** Ctrl EVs and IGF-1 EVs are taken up by MCF10A cells. Confocal microscopy analysis of MCF10A cells untreated and pretreated with A6730 and ERK1/2 inhibitor and then treated with unstained IGF-1 EVs, stained Ctrl EVs and stained IGF-1 EVs. Nucleus were

stained with Hoechst dye. Scale bar 40 µm. Graph represents the mean  $\pm$  SD and indicate the fold of fluorescence intensity value above Ctrl EVs fluorescence intensity value. ns, not significant

reorganization with the assembly of actin stress fibers anchored to focal adhesions (Gumbiner 2005; Lee et al. 2006). Downregulation of E-cadherin expression is mediated by a variety of transcription factors including Snail1, Snail2, Twist1, ZEB2, E47 and Sip1, which directly bind to specific sequences (E-boxes) on E-cadherin gene promoter and downregulate its transcription (Baranwal and Alahari 2009; Cano et al. 2000; Peinado et al. 2004). Our findings demonstrate that IGF-1 EVs induce downregulation of E-cadherin transcripts at 9 h of treatment and a transient downregulation of E-cadherin protein expression in MCF10A cells. Furthermore, IGF-1 EVs induce a transient upregulation of E-cadherin transcriptional repressors including Snail1, Twist1 and Sip1, whereas Ctrl EVs induce downregulation of Twist1 transcripts in MCF10A cells. Our findings

support the proposal that treatment of MDA-MB-231 cells with IGF-1 promotes changes in EVs cargos that mediate downregulation of E-cadherin expression in MCF10A cells. Moreover, we propose that Ctrl EVs have cargos that inhibit the expression of Twist1 in MCF10A cells, however it remains to be studied. Supporting our proposal, EVs from PAR-2 activated MDA-MB-231 cells induce downregulation of E-cadherin expression through transfer of microRNA221 to target MCF-7 breast cancer cells (Das et al. 2019).

During EMT process, epithelial cells assume a mesenchymal phenotype through acquisition of mesenchymal markers including N-cadherin, fibronectin,  $\alpha$ -SMA, vimentin, and fibroblast-specific-protein1 (Saitoh 2018). Our results demonstrate that IGF-1 EVs induce a transient increases of N-cadherin and vimentin expression at 9, 12 and 24 h of

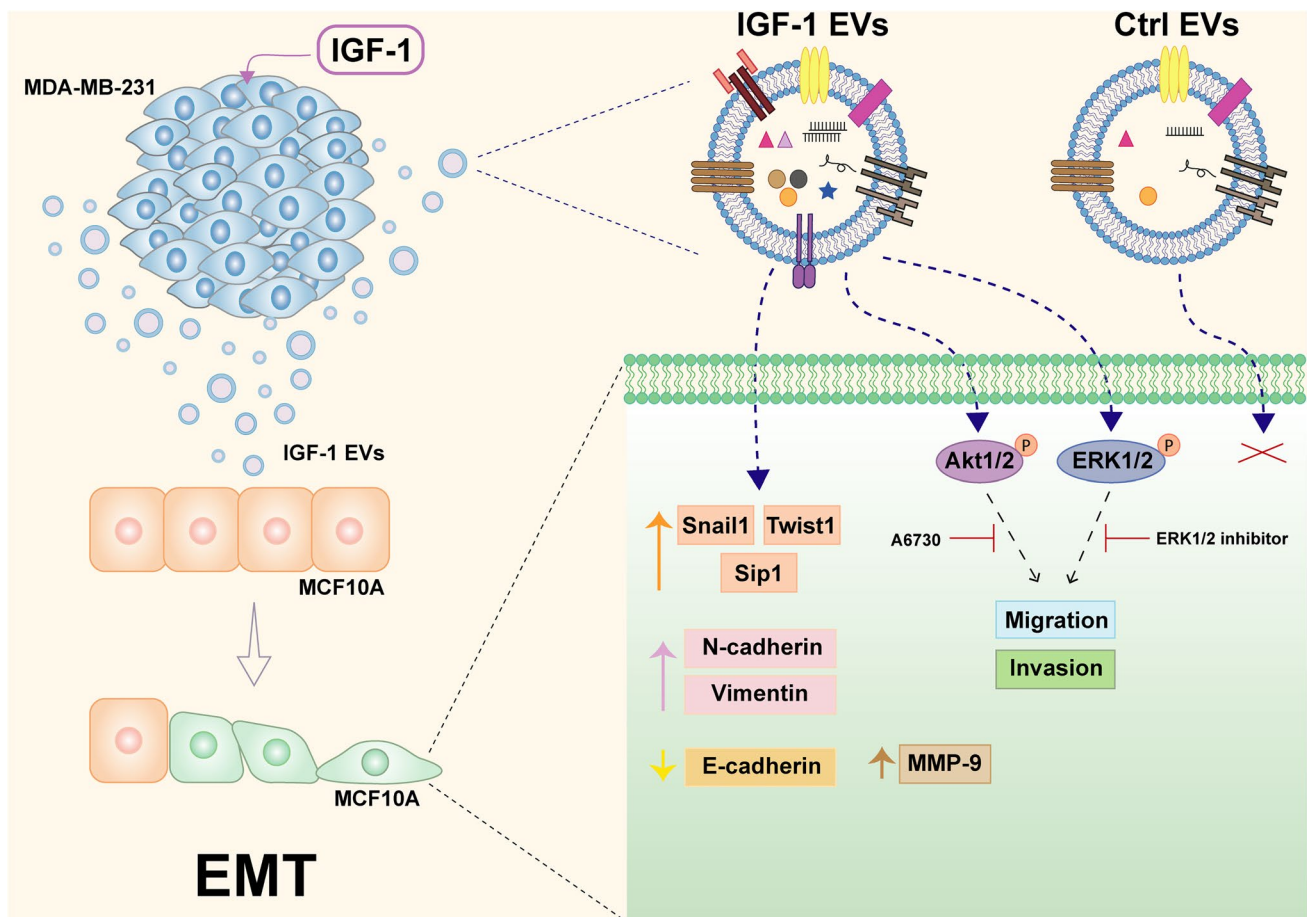
treatment in MCF10A cells. Moreover, IGF-1 EVs induce an increase of vimentin expression mainly in motile cells MCF10A, which are localized at the edges of the scratch. In agreement with our findings, EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA induce a transient increase of vimentin expression with two peaks of maximal expression, and a transient increase of N-cadherin expression with one peak of maximal expression in MCF10A cells (Galindo-Hernandez et al. 2014). Moreover, LA induces a transient increase of N-cadherin and vimentin expression with one peak of maximal expression in MCF10A cells (Espinosa-Neira et al. 2011). Since, EMT is a transient process used for tumor cells in the invasion and metastasis process (Thiery et al. 2009), we propose that different stimulators of EMT process induce the expression at different times of specific mesenchymal markers, including vimentin and N-cadherin, in MCF10A cells. Our findings support the proposal that IGF-1 EVs induce an EMT process in MCF10A cells and they suggest that IGF-1 EVs play an important role in tumor invasion and metastasis. Supporting our proposal, N-cadherin is involved in the detachment of tumor cells, migration and invasion; whereas the intermediate filament vimentin has been related with migration of epithelial cells and tumor invasion (Gavert and Ben-Ze'ev 2008; Hult et al. 2007; Thiery 2003).

One of the hallmarks of EMT is the capacity to invade the extracellular matrix, which involves the activation of signal transduction pathways that mediate specific cellular processes including the activation of NF $\kappa$ B and the secretion of MMPs (Gavert and Ben-Ze'ev 2008; Lu and Kang 2019). Particularly, NF $\kappa$ B is involved in the EMT process because it mediates expression of vimentin, MMP-9, Snail1/2, ZEB1/2 and Sip1 (Min et al. 2008). We demonstrate that IGF-1 EVs induce an increase of MMP-9 secretion and invasion in MCF10A cells. Interestingly, Ctrl EVs induce an increase of MMP-9 secretion but they do not induce invasion in MCF10A cells. EMT process involves a variety cell processes, including the loss of cell-cell adhesions, secretion of MMPs, remodeling of actin cytoskeleton, expression of specific integrins and invasion (Thiery et al. 2009; Yilmaz and Christofori 2009). We propose that Ctrl EVs have cargos that induce some cellular processes related with the EMT process, such as secretion of MMP-9, but they do not have all the cargos required to mediate an EMT process in MCF10A cells. Moreover, our results support the proposal that IGF-1 EVs induce an EMT process in MCF10A cells. In agreement with our findings, EVs from MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells induce secretion of MMP-9, TGF- $\beta$  and IL-6 in THP-1 monocytic cells (Redzic et al. 2013). Supporting our proposal, EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA and EVs from breast cancer patients induce an increase of MMP-2 and MMP-9 secretion, invasion and an EMT process in MCF10A cells (Galindo-Hernandez et al. 2015;

Galindo-Hernandez et al. 2014). Moreover, our findings support the proposal that ligands used for stimulation of breast cancer cells induce the release of EVs with a variety of cargos that mediate specific cellular responses in their target cells.

ERK1/2 signaling pathway regulates basic cellular processes including proliferation and differentiation, whereas hyperactivation of ERK1/2 has been implicated in cancer, inflammation and development disorders (Guo et al. 2020). Our findings demonstrate that IGF-1 EVs induce ERK1/2 activation and migration via ERK1/2 activity in MCF10A cells. Since, migration is a hallmark of EMT process (Gavert and Ben-Ze'ev 2008), our results demonstrate that IGF-1 EVs mediate an EMT process through ERK1/2 activation in MCF10A cells. In agreement with our findings, exosomes released from the highly metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97H induce an EMT process via ERK1/2 activation in the less aggressive hepatocellular carcinoma cell line HLE (Chen et al. 2018). Moreover, EVs from human umbilical cord mesenchymal stem cells induce migration and invasion via ERK1/2 activity in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells (Zhou et al. 2019). Our findings strongly suggest that EVs from breast cancer cells stimulated with IGF-1 play an important role in tumor invasion and metastasis in breast cancer through an EMT process mediated by ERK1/2 activation.

Mouse models and cell cultures have demonstrated that Akt1 participates in tumor initiation and that Akt1 activation has anti-migratory and anti-metastatic properties independent of breast cancer subtype (Dillon et al. 2009; Hinz and Jucker 2019; Li et al. 2018). In contrast, Akt2 activation mediates migration, invasion and metastasis (Dillon et al. 2009; Hinz and Jucker 2019; Irie et al. 2005). Our findings demonstrate that IGF-1 EVs induce Akt1 and Akt2 activation, and migration via Akt1 and/or Akt2 activity in MCF10A cells. Since, we used an inhibitor of Akt1 and Akt2 (A6730), we were not able to determine whether Akt1 and/or Akt2 mediate the migration induced by IGF1-EVs. Interestingly, EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA do not induce Akt1 activation, but they induce Akt2 activation and migration via Akt2 activity in MCF10A cells (Leal-Orta et al. 2019). Moreover, exosomes from the highly metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97H induce migration in the less aggressive hepatocellular carcinoma cell line HLE via an independent pathway of Akt1/Akt2, whereas EVs from endothelial cells accelerate skin wound healing in diabetic mice and induce Akt1 activation in skin fibroblasts from diabetic patients (Chen et al. 2018; Wei et al. 2020). These findings support the proposal that EVs released from different cell types unstimulated or stimulated with specific ligands induce activation of specific signal transduction pathways that mediate specific cellular responses in their target cells.



**Fig. 9** IGF-1 EVs induce an EMT process in mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A

Cancer cells communicate with surrounding cells and stroma through release and uptake of EVs, which are composed of a variety of cargos that mediate different cellular responses including angiogenesis, migration and invasion (Jurj et al. 2020; Ramirez-Ricardo et al. 2020). Our findings demonstrate that Ctrl EVs and IGF-1 EVs are taken up for the MCF10A cells. In agreement with our findings, EVs from MDA-MB-231 cells unstimulated and stimulated with LA are taken up for MCF10A cells, and EVs from healthy women and breast cancer patients are taken up for MDA-MB-231 cells (Leal-Orta et al. 2019; Ramirez-Ricardo et al. 2020). Moreover, our findings demonstrate that ERK1/2 and Akt1/2 activities are not required for the uptake of IGF-1 EVs in MCF10A cells. In agreement with our results, EVs from MDA-MB-231 cells stimulated with LA are taken up for MCF10A cells through an independent process of PI3K activity (Leal-Orta et al. 2019). It remains to be studied the role of ERK1/2 and Akt1/2 activities in the uptake of Ctrl EVs in MCF10A cells, and the signal transduction pathways involved in the uptake of Ctrl EVs and IGF-1 EVs in MCF10A cells.

In conclusion, our findings demonstrate that EVs from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with 10 nM IGF-1 induce an EMT process in mammary epithelial cells MCF10A (Fig. 9). Our findings describe a new role for IGF-1 EVs in the EMT process, and they strongly suggest that IGF-1 plays an important role in the invasion and metastasis process in breast cancer via the release of EVs from breast cancer cells.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00638-y>.

**Acknowledgements** We are grateful to Nora Ruiz and Maria de Lourdes-Rojas (LaNSE, Cinvestav-IPN) for their technical assistance in TEM.

**Funding** This research was funded by CONACYT (255429) and CONACYT-FOSISS (Salud 2015-1-261637), Mexico. Grants from CONACYT supported E L-O, J R-R and AG-H.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interests.

## References

- Anisimov VN, Bartke A (2013) The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev Oncol/hematol* 87:201–223. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.01.005>
- Baranwal S, Alahari SK (2009) Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 384:6–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.051>
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J Clin* 68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Cano A et al (2000) The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76–83. <https://doi.org/10.1038/35000025>
- Colombo M, Raposo G, Thery C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Chen L et al (2018) HCC-derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial–mesenchymal transition through MAPK/ERK signalling pathway. *Cell Death Dis* 9:513. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0534-9>
- Christopoulos PF, Msaouel P, Koutsilieris M (2015) The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Mol Cancer* 14:43. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0291-7>
- Das K et al (2019) Triple-negative breast cancer-derived microvesicles transfer microRNA221 to the recipient cells and thereby promote epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 294:13681–13696. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008619>
- Dillon RL, Marcotte R, Hennessy BT, Woodgett JR, Mills GB, Muller WJ (2009) Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res* 69:5057–5064. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4287>
- Duffy MJ, McGowan PM, Crown J (2012) Targeted therapy for triple-negative breast cancer: where are we? *Int J Cancer* 131:2471–2477. <https://doi.org/10.1002/ijc.27632>
- Espinosa-Neira R, Mejia-Rangel J, Cortes-Reynosa P, Salazar EP (2011) Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1782–1791. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.08.017>
- Farabaugh SM, Boone DN, Lee AV (2015) Role of IGF1R in breast cancer subtypes stemness, and lineage differentiation. *Front Endocrinol* 6:59. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00059>
- Firth SM, Baxter RC (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23:824–854. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0033>
- Galindo-Hernandez O et al (2015) Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial–mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol: J Int Soc Oncodev Biol Med* 36:9649–9659. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3711-9>
- Galindo-Hernandez O, Serna-Marquez N, Castillo-Sanchez R, Salazar EP (2014) Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins, Leukot, Essential Fatty Acids* 91:299–310. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.09.002>
- Gallagher EJ, LeRoith D (2010) The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol Metab* 21:610–618. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.007>
- Garcia-Hernandez A, Leal-Orta E, Ramirez-Ricardo J, Cortes-Reynosa P, Thompson-Bonilla R, Salazar EP (2020) Linoleic acid induces secretion of extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells that mediate cellular processes involved with angiogenesis in HUVECs. *Prostaglandins Other Lipid Med* 153:106519. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2020.106519>
- Gavert N, Ben-Ze'ev A (2008) Epithelial–mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med* 14:199–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.03.004>
- Godone RNL, Leitao GM, Araujo NB, Castelletti CHM, Lima-Filho JL, Martins DBG (2018) Clinical and molecular aspects of breast cancer: targets and therapies. *Biomed Pharmacother = Biomed Pharmacother* 106:14–34. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.066>
- Greening DW, Gopal SK, Mathias RA, Liu L, Sheng J, Zhu HJ, Simpson RJ (2015) Emerging roles of exosomes during epithelial–mesenchymal transition and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol* 40:60–71. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.008>
- Gross JM, Yee D (2003) The type-1 insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase and breast cancer: biology and therapeutic relevance. *Cancer Metastasis Rev* 22:327–336. <https://doi.org/10.1023/a:1023720928680>
- Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:622–634. <https://doi.org/10.1038/nrm1699>
- Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL (2020) ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* 19:1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Hinz N, Jucker M (2019) Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal: CCS* 17:154. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0450-3>
- Hult J et al (2007) N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Can Res* 67:3106–3116. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3401>
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999) The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20:761–787. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.6.0382>
- Irie HY et al (2005) Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial–mesenchymal transition. *J Cell Biol* 171:1023–1034. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505087>
- Jones RA, Campbell CI, Gunther EJ, Chodosh LA, Petrik JJ, Khokha R, Moorehead RA (2007) Transgenic overexpression of IGF-IR disrupts mammary ductal morphogenesis and induces tumor formation. *Oncogene* 26:1636–1644. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209955>
- Jurj A, Zanoaga O, Braicu C, Lazar V, Tomuleasa C, Irimie A, Berindan-Neagoe I (2020) A comprehensive picture of extracellular vesicles and their contents. *Mol Transf Cancer Cells Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers12020298>
- Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S (2016) Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci* 17:170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Kanada M, Bachmann MH, Contag CH (2016) Signaling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks. *Trends Cancer* 2:84–94. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.12.005>
- Ke Z et al (2006) MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. *Int J Cancer* 119:8–16. <https://doi.org/10.1002/ijc.21769>
- Leal-Orta E, Ramirez-Ricardo J, Cortes-Reynosa P, Galindo-Hernandez O, Salazar EP (2019) Role of PI3K/Akt on migration and invasion of MCF10A cells treated with extracellular vesicles from

- MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid. *J Cell Commun Signal* 13:235–244. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0490-2>
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2006) The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172:973–981. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601018>
- Li H, Bath IS, Qu X, Xu L, Song N, Wang R, Liu Y (2017) IGF-IR signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: overview and new insights. *Mol Cancer* 16:6. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0576-5>
- Li W et al (2018) Akt1 inhibition promotes breast cancer metastasis through EGFR-mediated beta-catenin nuclear accumulation. *Cell Commun Signal: CCS* 16:82. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0295-1>
- Lu W, Kang Y (2019) Epithelial–mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. *Dev Cell* 49:361–374. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.010>
- Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE (2008) NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem* 104:733–744. <https://doi.org/10.1002/jcb.21695>
- Motallebnezhad M, Aghabati-Maleki L, Jadidi-Niaragh F, Nickho H, Samadi-Kafil H, Shamsasenjan K, Yousefi M (2016) The insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in breast cancer: biology and treatment strategies. *Tumour Biol: J Int Soc Oncodev Biol Med* 37:11711–11721. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5176-x>
- Papa V et al (1993) Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Can Res* 53:3736–3740
- Park MJ et al (2000) Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Letters* 290:201–204. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01358-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01358-6)
- Peinado H, Portillo F, Cano A (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48:365–375. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041794hp>
- Ramirez-Ricardo J et al (2020) Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDAMB231 breast cancer cells. *Mol Med Rep* 22:1932–1948. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11259>
- Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200:373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Redzic JS et al (2013) Extracellular vesicles secreted from cancer cell lines stimulate secretion of MMP-9, IL-6, TGF-beta1 and EMM-PRIN. *PLoS ONE* 8:e71225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071225>
- Saitoh M (2018) Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem* 164:257–264. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy047>
- Seccareccia E, Brodt P (2012) The role of the insulin-like growth factor-i receptor in malignancy: an update. *Growth Horm IGF Res: off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc* 22:193–199. <https://doi.org/10.1016/j.gHIR.2012.09.003>
- Thiery JP (2003) Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15:740–746. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.006>
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F (2014) Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *AmJ Physiol Cell Physiol* 306:C621–633. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2013>
- Vader P, Breakefield XO, Wood MJ (2014) Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med* 20:385–393. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.03.002>
- Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M (2020) The landscape of targeted therapies in TNBC. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers12040916>
- Wang Y, Cao S, Chen Y (2015) Molecular treatment of different breast cancers. *Anticancer Agents Med Chem* 15:701–720. <https://doi.org/10.2174/1871520615666150129211901>
- Wei F et al (2020) Plasma endothelial cells-derived extracellular vesicles promote wound healing in diabetes through YAP and the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Aging* 12:12002–12018. <https://doi.org/10.18632/aging.103366>
- Yakar S, Leroith D, Brodt P (2005) The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: lessons from animal models. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:407–420. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.010>
- Yilmaz M, Christofori G (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28:15–33. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>
- Zhou X et al (2019) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote the in vitro proliferation and migration of breast cancer cells through the activation of the ERK pathway. *Int J Oncol* 54:1843–1852. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4747>
- Zielinska HA, Bahl A, Holly JM, Perks CM (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: a role for insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 3? *Breast Cancer* 7:9–19. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S43932>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.