



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**“Participación de ciclooxygenasa-1 en la secreción/cargo de vesículas
extracelulares en los procesos de migración y metástasis en un
modelo *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. Mónica Vizcarra Soto

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOLOGÍA CELULAR

Director de tesis:

Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Ciudad de México

Julio de 2023

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular (Laboratorio 42) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. José Eduardo Pérez Salazar. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría, No. 1110820.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCION	3
1.1. Cáncer de mama	3
1.1.1. Epidemiología global	3
1.1.2. Epidemiología nacional	3
1.1.3. Anatomía de la glándula mamaria	4
1.1.4. Progresión de cáncer mamario.....	5
1.1.5. Clasificación molecular.....	9
1.1.6. Factores de riesgo.....	11
1.2. Ácidos grasos	14
1.2.1. Clasificación	14
1.2.2. Función	15
1.2.3. Ácidos grasos en cáncer	19
1.2.4. Ácido Linoleico	20
1.3. Vía ácido araquidónico en cáncer	20
1.3.1. Ciclooxygenasa	21
1.4. Vesículas Extracelulares.....	22
1.4.1. Clasificación	22
1.4.2. Biogénesis.....	24
1.4.3. Cargo	26
1.4.4. Captura	27
1.4.5. VEs en cáncer de mama	28
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. HIPÓTESIS.....	32
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo general.....	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. METODOLOGÍA.....	33

5.1.	Diseño experimental	33
5.2.	Materiales	33
5.3.	Cultivos celulares.....	33
5.4.	Estimulación con AL e inhibición de COX-1	34
5.5.	Aislamiento de VEs derivadas de medios condicionados.....	34
5.6.	Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	34
5.7.	Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)	35
5.8.	Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”	35
5.9.	Ensayos de invasión en cámara de Boyden.....	36
5.10.	Inmunodetección	37
5.11.	Ensayo de tinción y captura de VEs	37
5.12.	Metástasis <i>in vivo</i>	38
5.13.	Análisis estadístico	39
6.	RESULTADOS	40
6.1.	COX-1 participa en la migración e invasión inducida por AL en células TNBC.....	40
6.2.	Caracterización de VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL e inhibidor de COX-1.....	44
6.3.	Las VEs derivadas de MDA-MB-231 con distintos tratamientos son capturadas por células 4T1 de forma diferencial.....	47
6.4.	Las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen migración en células 4T1.	49
6.5.	El pretratamiento de células 4T1 con VEs AL induce metástasis a pulmón e hígado.	50
7.	DISCUSIÓN	55
8.	CONCLUSIÓN	58
9.	PERSPECTIVAS.....	59
10.	REFERENCIAS.....	60

RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel nacional y mundial. La mayoría de las muertes por cáncer se asocian a un proceso de metástasis, para lo cual las células de cáncer deben realizar procesos celulares como migración e invasión, que pueden ser promovidos por vesículas extracelulares (VEs) derivadas de las células de cáncer. El alto consumo de ácidos grasos omega 6 se ha identificado como un factor de riesgo en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, no obstante, los mecanismos moleculares por los cuales actúan no se han dilucidado completamente. Estudios *in vitro* han demostrado que el ácido linoleico (AL), principal ácido graso omega 6 en la dieta occidental, induce migración e invasión en células de cáncer de mama MDA-MB-231 a través de la activación del receptor de ácidos grasos libres 4 (FFAR4), y parcialmente de la actividad de COX-2. Así mismo, el ácido linoleico induce la liberación de VEs en células MDA-MB-231, que inducen migración e invasión en esta misma línea celular, así como la transición epitelio mesénquima en células MCF10A. En el presente trabajo, demostramos que la migración e invasión inducida por AL es dependiente de la actividad de COX-1 en células MDA-MB-231 y 4T1. También se mostró que el AL induce un aumento en la secreción de VEs, el cual es independiente de la actividad de COX-1 en células MDA-MB-231. Sin embargo, al estimular células 4T1 con estas VEs, observamos que las VEs secretadas por MDA-MB-231, inducidas por AL se capturan en mayor proporción, y que al inhibir COX-1, las VEs derivadas pierden este aumento en su afinidad por células 4T1. De manera similar, se observó que las VEs estimuladas por AL inducen migración en las células 4T1, y aumentan su capacidad metastásica a pulmón e hígado, pero al inhibir COX-1 en las células de origen, las VEs derivadas no inducen estos efectos. Por lo tanto, los resultados de este trabajo sugieren que el AL induce la inclusión de moléculas en las de VEs que provocan una mayor capacidad metastásica en células de cáncer de mama, y este cargo es dependiente de la actividad de COX-1.

ABSTRACT

Breast cancer is the neoplasia with the highest incidence and mortality in women, nationally and worldwide. Most cancer deaths are associated with a process of metastasis, for which cancer cells must undergo cellular processes such as migration and invasion, which can be promoted by extracellular vesicles (EVs) derived from cancer cells. On the other hand, the high consumption of omega 6 fatty acids has been identified as a risk factor in the development and progression of breast cancer, however, the molecular mechanisms have not been fully elucidated. *In vitro* studies have shown that linoleic acid (LA), the main omega-6 fatty acid in the Western diet, induces migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells through free fatty acids receptor 4 (FFAR4) activation, and partially through COX-2 activity. Likewise, linoleic acid induces the release of EVs in MDA-MB-231 cells, which induce migration and invasion in this same cell line, as well as the epithelium-mesenchymal transition in MCF10A cells. In the present work, we demonstrate that LA-induced migration and invasion is dependent on COX-1 activity in MDA-MB-231 and 4T1 cells. It was also shown that LA induces an increase in EVs secretion, which is independent of COX-1 activity in MDA-MB-231 cells. However, stimulating 4T1 cells with these EVs, we observed that the EVs secreted by MDA-MB-231, induced by LA, are captured in a greater proportion and by inhibiting COX-1, the derived EVs lose this increase in their affinity to 4T1 cells. Similarly, it was shown that EVs stimulated by LA induce migration in 4T1 cells and increase their metastatic capacity to lung and liver, but by inhibiting COX-1 in the cells of origin, the derived EVs do not induce these effects. Therefore, the results of this work suggest that LA induces the inclusion of molecules in EVs that cause a greater metastatic capacity in breast cancer cells, and this charge is dependent on COX-1 activity.

1. INTRODUCCION

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es un tipo de cáncer que se desarrolla a partir de las células epiteliales que forman los ductos y lóbulos de la glándula mamaria. Es una enfermedad heterogénea que se desarrolla por el impacto tanto de factores genéticos como ambientales, que conllevan a la acumulación de mutaciones genéticas y modificaciones epigenéticas que inducen una proliferación no controlada con posterior invasión y metástasis (Ataollahi et al., 2015).

1.1.1. Epidemiología global

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia en ambos sexos, con un total de 2,261,419 casos en 2020, lo cual representa el 11.7% de todos los casos de cáncer, mientras que estadísticamente para el sexo femenino, esta cifra representa el 24.5% del total de casos de cáncer. Además, este mismo año se reportaron un total de 684,996 muertes, equivalente al 6.9% del total de defunciones por cáncer para ambos sexos, y al 15.5% de defunciones por cáncer para el sexo femenino, siendo la principal causa de muerte por cáncer (GLOBOCAN, 2020a).

En la región de Norteamérica y Europa, países con mayor desarrollo económico, se presentan tasas de incidencia estandarizada más altas (≥ 71.6 casos por cada 100 mil habitantes), mientras que las tasas de mortalidad son más altas en la región de África (≥ 20.2 casos por cada 100 mil habitantes), países con menor desarrollo económico (GLOBOCAN, 2020c).

1.1.2. Epidemiología nacional

En México, se reportaron un total de 7,973 defunciones por cáncer de mama en 2021, representando el 17% del total de defunciones por cáncer en mujeres, siendo por tanto la principal causa de muerte por neoplasia (INEGI, 2022). Además, el cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia en mujeres, con un total de 29,929 casos reportados en el 2020 (GLOBOCAN, 2020b). Los estados con

mayor tasa de mortalidad en 2021 (<21.79 casos por cada 100 mil habitantes) fueron Colima, Tamaulipas, Sonora, Chihuahua, Ciudad de México, Nuevo León y Jalisco, siendo la media nacional de 18 casos por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2022).

1.1.3. Anatomía de la glándula mamaria

La base de la mama femenina se encuentra entre la segunda y sexta costilla de la pared torácica anterior, sobreponiéndose al músculo pectoral mayor. El tejido mamario se compone por un 10-15% de parénquima epitelial y el resto lo compone el estroma. Estructuralmente, la mama se conforma por 15 a 20 lóbulos separados por tejido adiposo, que a su vez se dividen en 20 a 40 lobulillos, cada uno formado por glándulas túbulo-alveolares ramificadas. Estos lóbulos desembocan en ductos galactóforos que convergen en un seno galactóforo que abre hacia el pezón. El 75% del drenaje linfático de la mama se realiza por los ganglios linfáticos axilares, los cuales generalmente son de 20 a 30 ganglios, clasificados en tres niveles (Figura 1). En el nivel I se encuentran los ganglios ubicados lateralmente al músculo pectoral menor, los ganglios del nivel II se localizan en la parte interna y superficial al músculo pectoral menor, así como en el nivel III se encuentran los ganglios mediales al músculo pectoral menor. El drenaje linfático es la principal ruta de diseminación metastásica en el cáncer de mama (Pandya y Moore, 2011).

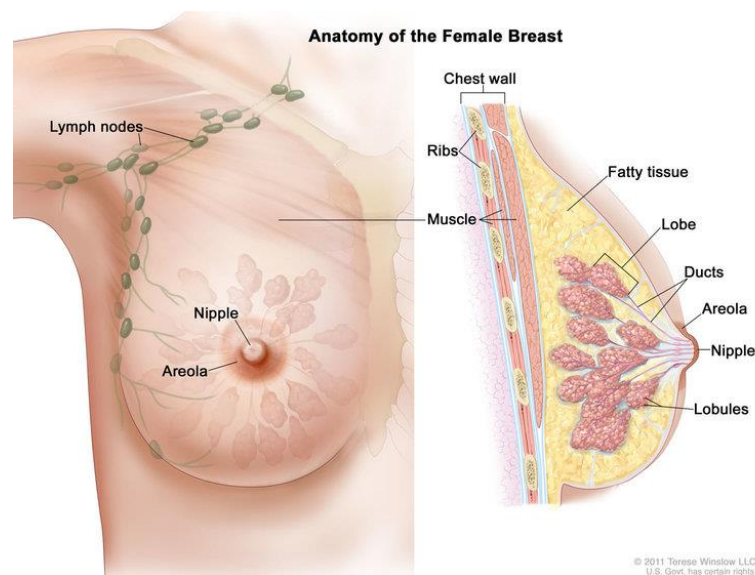


Figura 1. Anatomía de la mama femenina (tomada de Winslow, 2011).

Los ductos mamarios están formados por una capa interna de células epiteliales lumbinales que producen leche en la lactancia y una capa externa de células mioepiteliales que producen la membrana basal, la cual separa el compartimento epitelial del estroma. Este último se compone de matriz extracelular y células endoteliales, fibroblastos, miofibroblastos, leucocitos, adipocitos, entre otras, rodeando los ductos mamarios. Así mismo, las células epiteliales lumbinales presentan una polaridad apico-basal (Polyak y Kalluri, 2010).

1.1.4. Progresión de cáncer mamario

Los tumores mamarios por lo general inician como una hiperproliferación de células de los ductos mamarios, generando tumores benignos, los cuales pueden desarrollarse en carcinomas metastásicos debido a diferentes factores carcinogénicos. El microambiente tumoral también participa ampliamente en el desarrollo del cáncer de mama (Sun et al., 2017).

En el carcinoma ductal *in situ* (DCIS) se presentan células neoplásicas proliferantes confinadas a los ductos mamarios, disminuye el número de células mioepiteliales y aumenta el número de células del estroma debido a señales provenientes de las células epiteliales tumorales. Tras una combinación de señales provenientes de las células epiteliales tumorales y estromales, los progenitores de células mioepiteliales realizan una diferenciación aberrante, que conlleva a la desaparición de la capa mioepitelial; este evento define la progresión al carcinoma ductal invasivo (CDI) (Polyak y Kalluri, 2010) (Figura 2). Esta progresión es promovida por fibroblastos e inhibida por células mioepiteliales; se ha demostrado que para la correcta diferenciación de células mioepiteliales, se necesita una comunicación entre las células lumbinales y mioepiteliales, involucrando vías de señalización de TGF β , Hedgehog (Hh), adhesión celular y p63; mientras que la pérdida de esta red de señalización provoca la desaparición de células mioepiteliales (Hu et al., 2008).

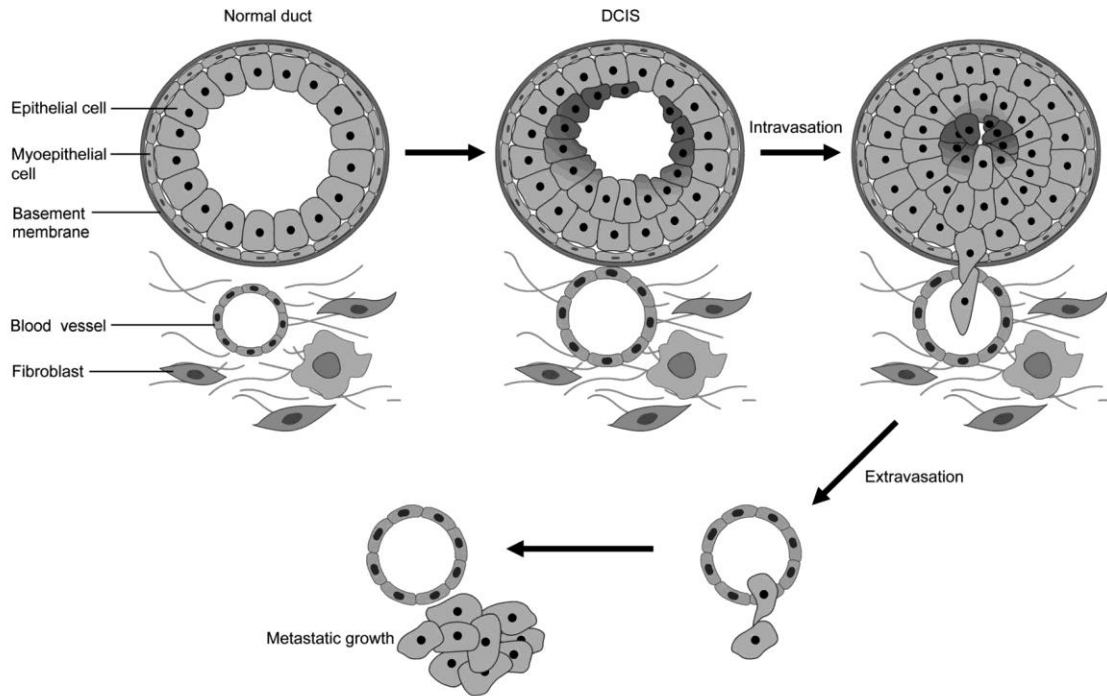


Figura 2. Alteraciones microambientales durante la progresión tumoral en cáncer mamario. Vista esquemática de mama normal, carcinoma ductal “in situ” (DCIS), carcinoma ductal invasivo (CDI) y carcinoma de mama metastásico (tomado de Scully et al. 2012).

El término metástasis se refiere al desarrollo de tumores secundarios en zonas lejanas al tumor original o tumor primario. La metástasis tiene un papel relevante en la ineficacia de las terapias contra el cáncer y en sus altos índices de mortalidad. El desarrollo de metástasis requiere de una cascada de eventos, iniciando con la invasión de las células cancerosas a tejidos circundantes, intravasación de las mismas a vasos linfáticos o sanguíneos, circulación, extravasación al sitio metastásico, aclimatación al nuevo microambiente, así como la evasión del sistema inmunitario (Figura 3). En esta serie de eventos, la invasión a tejidos circundantes y la adaptación en sitios distantes son características centrales de la malignidad del cáncer (Fares, 2020).

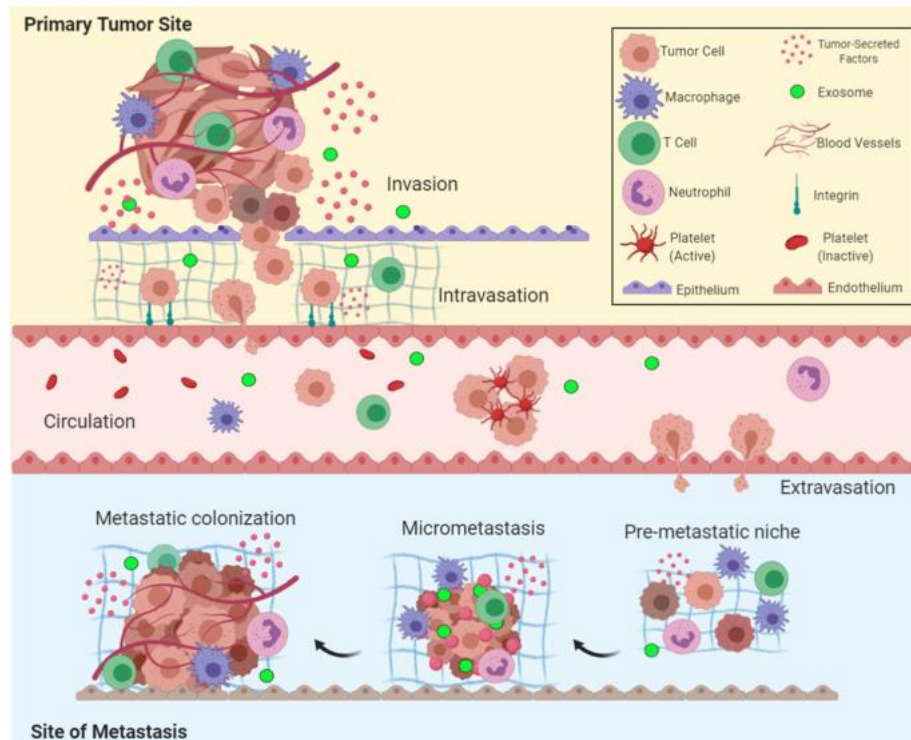


Figura 3. Descripción general de la cascada metastásica: los cinco pasos clave de la metástasis incluyen invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización (tomada de Fares et al., 2020).

El proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) consiste en una transdiferenciación en la cual las células epiteliales transformadas, usualmente inmóviles y fuertemente adheridas entre ellas y a su matriz extracelular, adquieren un fenotipo mesenquimal, caracterizado por su capacidad de invadir, resistir estrés y diseminarse, lo cual es esencial en la progresión del cáncer y metástasis. En este proceso, las células pasan por varios estadios entre los fenotipos epitelial y mesenquimal; la transición a cada etapa se regula por distintos factores de crecimiento y vías de señalización, así como factores de transcripción que suprimen la expresión de genes epiteliales y activan la expresión de genes mesenquimales. Las células tumorales en estadios intermedios entre epitelial y mesenquimal son más eficaces en la circulación, colonización y desarrollo de metástasis, en tanto que las células con fenotipo más mesenquimal proliferan cerca de células inflamatorias y endoteliales, liberando quimiocinas y proteínas atrayentes de células del sistema inmunitario con el objetivo de estimular la angiogénesis. El proceso inverso

transición mesénquima-epitelio se requiere para la colonización, formación de tumores secundarios y consecuentemente para la progresión de la metástasis. Las integrinas son proteínas transmembranales de señalización, que participan en el proceso de extravasación y colonización de las células tumorales, así como facilitan la supervivencia independiente de anclaje. En este proceso, además, las células de cáncer inducen necrosis programada a células endoteliales para realizar la extravasación y metástasis (Fares et al., 2020).

Durante la metástasis, las células tumorales requieren migrar del sitio primario, una vez que alcanzan un fenotipo invasivo, ya sea de forma individual o colectiva. En tumores con menor grado de diferenciación, esta migración suele ser individual, siendo el proceso de TEM esencial en este tipo de migración, puesto que tras la pérdida de las adhesiones celulares y la polaridad apical-basal a una polaridad posterior-frontal, se remodela el citoesqueleto con cambios en la actina cortical y formación de fibras de estrés (Figura 4). Este movimiento es facilitado por la activación de enzimas proteolíticas como metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Scully et al., 2012).

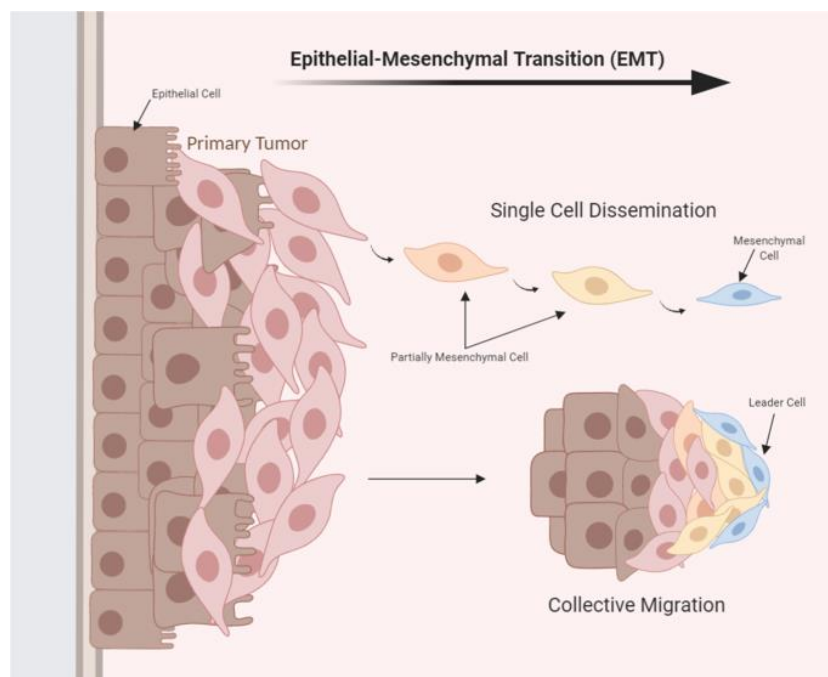


Figura 4. Transición epitelio mesénquima (TEM): La TEM ocurre a través de la migración unicelular o a través de la migración colectiva. El proceso consta de varias

etapas de transición entre la célula epitelial inicial y la célula mesenquimatosa invasiva (tomada de Fares et al. 2020).

Las MMPs son endopeptidasas capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular, así como son capaces de activar quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento que participan en la progresión tumoral y en la remodelación del nicho metastásico. Las MMPs generalmente son sintetizadas principalmente por los fibroblastos, participando en la remodelación de los tejidos; en tumores mamarios las MMPs participan en la remodelación de la matriz extracelular, provocando la rigidez de la matriz extracelular debido al entrecruzamiento anormal del colágeno. Estos procesos inducen la señalización por integrinas y factores de crecimiento, mismos que promueven la invasión. En particular, las integrinas están sobreexpresadas en la mayoría de los tipos de cáncer, estando algunos heterodímeros asociados a un mal pronóstico (Place et al., 2011).

La angiogénesis también es fundamental en la generación y desarrollo de metástasis. Sin embargo, la vascularización tumoral presenta cambios estructurales, funcionales y genéticos, lo cual provoca un suministro de oxígeno deficiente, provocando hipoxia. La hipoxia induce la producción de factores proangiogénicos y un mayor incremento de vascularización anormal; este microambiente hipóxico favorece la invasión y metástasis de las células tumorales (Scully et al., 2012).

1.1.5. Clasificación molecular

Se han caracterizado 4 subtipos principales de cáncer de mama, basados en la expresión del receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR), así como del receptor al factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2). Los subtipos moleculares son Luminal A, Luminal B, enriquecido en HER2 y tipo Basal o triple negativo (Cuadro 1) (Selmin et al., 2020).

- Luminal-A (LUM-A): Este subtipo es positivo para ER y/o PR, y negativo para HER2, teniendo además baja expresión de marcadores de proliferación como

Ki-67. Estos tumores tienen un crecimiento lento y presentan un mejor pronóstico.

- Luminal-B (LUM-B): Presenta receptores ER y/o PR, y puede ser negativo o positivo para HER2, con altos niveles de expresión de Ki-67. El crecimiento del tumor es ligeramente más rápido y su pronóstico es ligeramente menos favorable.
- Enriquecido en HER2: Este subtipo es negativo para ER y PR, y presenta sobreexpresión de HER2. El tumor tiene un crecimiento más acelerado y un pronóstico menos favorable. Sin embargo, existen tratamientos eficaces dirigidos contra HER2.
- Triple Negativo (TNBC): Este subtipo es negativo para los receptores ER, PR y HER2. Representa del 15-20% de los casos de cáncer de mama, tienen un bajo pronóstico y un alto riesgo de recurrencia y metástasis. El tumor es más frecuente en mujeres premenopáusicas y representa el 39% de los casos de cáncer de mama en mujeres africanas, 20% en mujeres caucásicas hispanas, y 16% en mujeres caucásicas no hispanas. El 80% de los TNBC corresponde a carcinomas ductales invasivos.

Cuadro 1. Subtipos moleculares del cáncer de mama.

Subtipo molecular	ER	PR	HER2
Luminal A	+/-	+	
Luminal B	+/-	+/- (<20%), ki67>14%	-
Luminal B	+/-	+/-	+
Enriquecido en HER2	-	-	+
Tipo, Basal (TNBC)	-	-	-

Tomada de Selmin et al., 2020.

El cáncer de mama TNBC representa una forma agresiva de la enfermedad, generalmente detectada en estadios más avanzados, con tumores de mayor tamaño e histológicamente poco diferenciados y diagnosticado a edades más tempranas (Ellsworth et al., 2019). El TNBC además tiene una mayor probabilidad

de recurrencia en los primeros dos a tres años del diagnóstico inicial y formar metástasis, principalmente en hueso, pulmón, cerebro y ganglios linfáticos distantes (Harbeck et al., 2019).

1.1.6. Factores de riesgo

Cáncer de mama en hombres

El cáncer de mama se presenta de forma muy esporádica en hombres, y representa sólo el 1% del total de casos, con únicamente el 0.5% de la mortalidad. De los casos de cáncer de mama en hombres, el 20% tienen familiares de primer grado con casos de cáncer de mama y del 4-14% presentan mutaciones del gen *BRCA2*. Así mismo, familias con esta mutación tienen una probabilidad del 60–76% de presentar al menos un caso de cáncer de mama en hombre (Harbeck et al., 2019).

Hormonal

La edad de la menarquia y la menopausia incrementan el riesgo de cáncer de mama, con un factor de 1.05 por cada año de edad temprana en que se presente la menarquia, siendo la edad media a los 13.1 años y un factor de 1.029 por cada año mayor en la menopausia, a partir de la edad media de 49.3 años. Además, mujeres premenopáusicas tienen mayor riesgo de presentar cáncer de mama que mujeres postmenopáusicas de la misma edad (Cancer, 2012). El uso de estrógenos de origen externo también es un factor de riesgo, que puede deberse al daño mutagénico generado por radicales libres y metabolitos provenientes del estrógeno, así como a la capacidad del estrógeno de inducir proliferación en células precancerosas y lesiones cancerosas (Ataollahi et al., 2015).

Reproductivos

El primer embarazo induce cambios hormonales, como una reducción de prolactina y estrógeno, y la diferenciación terminal del tejido mamario, lo que representa un factor protector del cáncer de mama. Además, tras el embarazo

disminuye el número de células luminales sensibles a hormonas y disminuye la señalización Wnt en células progenitoras, disminuyendo así la susceptibilidad a carcinógenos (Colditz et al., 2014). Sin embargo, cabe destacar que la edad del primer embarazo es un factor importante, ya que mujeres con su primer embarazo a la edad de 30 años o más, tienen un riesgo 1.5 veces mayor de presentar cáncer de mama, respecto a mujeres con su primer embarazo a edad de 19 años o menos (Li et al., 2008).

Genético

Aproximadamente el 20% de los casos de cáncer de mama son de origen familiar, se presenta a edades tempranas y está mediado por mutaciones específicas en genes predisponentes de la enfermedad. Las mutaciones en el gen *BRCA1* aumentan un 51-85% el riesgo de padecer cáncer de mama a la edad de 50-70 años (Ataollahi et al., 2015). Las mutaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53* se presentan en al menos la mitad de los casos con historia familiar con cáncer de mama y en menos del 10% de los casos sin historia familiar en mujeres menores a 30 años (Anders et al., 2009). *BRCA1* y *BRCA2* codifican proteínas tumor supresoras. Así mismo, *BRCA2* regula la recombinación en la reparación de rupturas de doble cadena del DNA, mientras que *BRCA1* es esencial en la reparación de ADN por recombinación homóloga y unión de extremos no homóloga (Sun et al., 2017). Entre el 70-90% y 16-23% de casos de cáncer de mama TNBC presentan mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* respectivamente, sin embargo las mutaciones de línea germinal de estos genes sólo representan el 15.4% de los casos de TNBC (Ellsworth et al., 2019).

Edad

Aproximadamente el 7% de mujeres con cáncer de mama son diagnosticadas antes de los 40 años, aunque este tipo de cáncer representa el 40% de todos los tipos de cáncer en mujeres en este rango de edad (Anders et al., 2009). Los índices de supervivencia son más bajos en este grupo, y presentan un mayor índice de metástasis en ganglios linfáticos axilares (Zhao et al., 2015). Así mismo,

cabe destacar que en México, la edad media de diagnóstico de cáncer de mama es a los 51 años, siendo el 45% de los casos diagnosticados antes de la edad de 50 años; mientras que en Estados Unidos y Europa la edad media de diagnóstico es a los 63 años, y sólo un 25% de los casos se diagnostican antes de la edad de 50 años (Rodríguez-Cuevas et al., 2001; Cejudo-Arteaga et al., 2022).

Lactancia

Algunos estudios sugieren fuertemente que la lactancia es un factor protector contra el cáncer de mama, principalmente si se lleva a cabo en periodos mayores a un año. Este factor puede estar relacionado con la disminución del total de ciclos menstruales (Society, 2022).

Estilo de vida

En metaanálisis se ha encontrado una relación entre la exposición al humo de cigarro y el riesgo de cáncer de mama (Ataollahi et al., 2015). El fumar se ha asociado al desarrollo de cáncer de mama, particularmente si se inicia a edades tempranas en la adolescencia o perimenarquia (Jones et al., 2017). El consumo regular de alcohol es un factor de riesgo bien establecido para el desarrollo de cáncer de mama. Algunas posibles explicaciones son que aumenta el nivel de estrógenos, la exposición a acetaldehído, estrés oxidativo y que disminuye la concentración de ácido retinoico (Vieira et al., 2018).

Dieta

En mujeres postmenopáusicas, la obesidad y el alto índice de masa corporal incrementan el riesgo del cáncer de mama. Además, existe una correlación entre el alto consumo de calorías, grasas y proteínas animales con el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Ataollahi et al., 2015). Así mismo, también se ha descrito que el alto consume de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y monoinsaturados (MUFA) *trans* incrementa de manera significativa el riesgo de cáncer de mama (Tayyem et al., 2019). Sin embargo, el papel de los ácidos grasos en los mecanismos de progresión en cáncer mamario ha sido poco estudiado.

1.2. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con estructura RCOOH, que se conforman de un extremo metilo con una cadena hidrocarbonada (R-) y un extremo carboxílico (-COOH). Se pueden representar con la fórmula CN:p n-x, donde CN es el número total de átomos de carbono, p el número de dobles enlaces, x la posición del primer doble enlace y n (ω) la posición a partir del extremo metilo (Tvrzicka, 2011). Los ácidos grasos son el principal componente de otros lípidos complejos como fosfolípidos, ésteres de colesterol y triacilglicéridos, mayor fuente de la grasa dietética en humanos. Son transportados por el torrente sanguíneo mediante lipoproteínas (Calder, 2015).

1.2.1. Clasificación

Estructura

Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados (con dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada) y su longitud varía entre 2 y 36 átomos de carbono. En plantas, los ácidos grasos más abundantes van de 16 a 18 átomos de carbonos, mientras que en mamíferos varían entre 12 y 24 carbonos y 0 a 6 dobles enlaces. Aproximadamente la mitad de ácidos grasos presentes en plantas y animales son insaturados. Los ácidos grasos saturados se dividen en cadena corta (SCFA) como el ácido acético (2:0), propiónico (3:0) y butírico (4:0); ácidos grasos saturados de cadena media (MCFA) como el caproico (6:0), caprílico (8:0), cáprico (10:0) y los ácidos grasos saturados de cadena larga como el ácido láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0), que representan el 80-90% del consumo de ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) pueden encontrarse en configuración *cis* (los hidrógenos del doble enlace se localizan en la misma orientación), siendo el ácido oléico (18:1n-9c) y palmitoléico (18:1n-7c) representativos de este grupo, o en *trans* (hidrógenos en orientación opuesta). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son principalmente de la familia n-9 y son

considerados esenciales. Entre mayor es el número de dobles enlaces, más propensos son a la lipoperoxidación (Tvrzicka et al., 2011).

Esenciales

Los ácidos grasos pueden provenir de una fuente exógena o endógena (síntesis *de novo*). Los ácidos grasos esenciales son fundamentales para el desarrollo de algunos organismos y provienen principalmente de fuente exógena mediante su consumo, ya que no son sintetizados en cantidades insuficientes por el organismo (de Carvalho and Caramujo, 2018). Entre estos se encuentran el ácido linoleico (AL; 18:2n-6) y el ácido α -linoleico (ALA; 18:3n-3). Los PUFAs de cadena larga, como el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3), el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3) y el ácido araquidónico (AA; 20:4n-6) son esenciales condicionados; pueden ser sintetizados por elongación y desaturación de AL y ALA pero de manera ineficiente (Tvrzicka et al., 2011).

1.2.2. Función

La degradación de ácidos grasos a través de la beta-oxidación es un proceso central para la obtención de energía. Para ello, los ácidos grasos son convertidos a acil-CoA dentro de la célula, posteriormente forman acil-carnitina mediante la enzima carnitina-transferasa, para ser transportados a la mitocondria por una translocasa. Dentro de la mitocondria vuelven a formar acil-CoA, y comienza la beta-oxidación. Esta consiste en cuatro reacciones recurrentes: oxidación por FAD, hidratación, oxidación por NAD y tiólisis; como resultado, la cadena del ácido graso se acorta dos carbonos y se forma una molécula de Acetil-CoA, una molécula de FADH₂ y una molécula de NADH + H⁺ (Bartlett y Eaton, 2004).

Los ácidos grasos forman parte de las membranas biológicas como parte de fosfolípidos, esfingolípidos y gangliósidos, y su composición modula las propiedades biofísicas de estas membranas, su fluidez y a su vez la funcionalidad y movimiento de las proteínas de membrana. Las balsas lipídicas son microdominios que sirven como plataformas de señalización celular y son ricos en ácidos grasos saturados. Adicionalmente, el ácido mirístico y palmítico modifican covalentemente

algunas proteínas para su anclaje a la membrana plasmática o para su transporte entre organelos (Calder, 2015).

El consumo balanceado de ácidos grasos poliinsaturados ω -6 y ω -3 es esencial para mantener un estado saludable en el ser humano. Un consumo mayor de PUFAs ω -6 PUFA tiene consecuencias proinflamatorias. La Unión Europea recomienda mantener un bajo consume de ácidos grasos saturados y monoinsaturados trans, mientras que para el AL y el ALA se recomienda un consumo de 4% y 0.5% de la ingesta calórica total respectivamente. Dependiendo de la localización, el tiempo de liberación y la señalización derivada de los ácidos grasos, estos pueden almacenarse en forma de triglicéridos, ser oxidados como fuente de energía, actuar como toxina o como recurso para el crecimiento (de Carvalho y Caramujo, 2018).

Los ácidos grasos pueden actuar como moléculas de señalización, controlando la expresión de diversos genes, así como procesos fisiológicos y patológicos. Los PUFAs n-3 actúan como ligando del receptor PPAR- α , con efectos pleiotrópicos en el metabolismo lipídico y energético, como la disminución de la lipogénesis y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Los PUFAs n-6 tienen mayor afinidad al receptor PPAR γ que al receptor PPAR α e influyen la producción de citocinas, incrementan la síntesis de colesterol y disminuyen la conversión de VLDL a LDL (Nakamura et al., 2014).

Además de estas vías de señalización, algunos ácidos grasos se han identificado como ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) previamente identificados como receptores huérfanos, ahora denominados como receptores de ácidos grasos libres (FFARs/FFAs). FFAR1 (GPR40) y FFAR4 (GPR120) son activados por MCFAs y LCFAs, mientras que los receptores FFAR2 (GPR3) y FFAR3 (GPR41) son activados por SCFAs (Figura 5). Estos receptores tienen funciones fisiológicas como facilitar la secreción de insulina, diferenciación de adipocitos, efectos antiinflamatorios, respuestas neuronales y preferencias de sabor (Kimura et al., 2020).

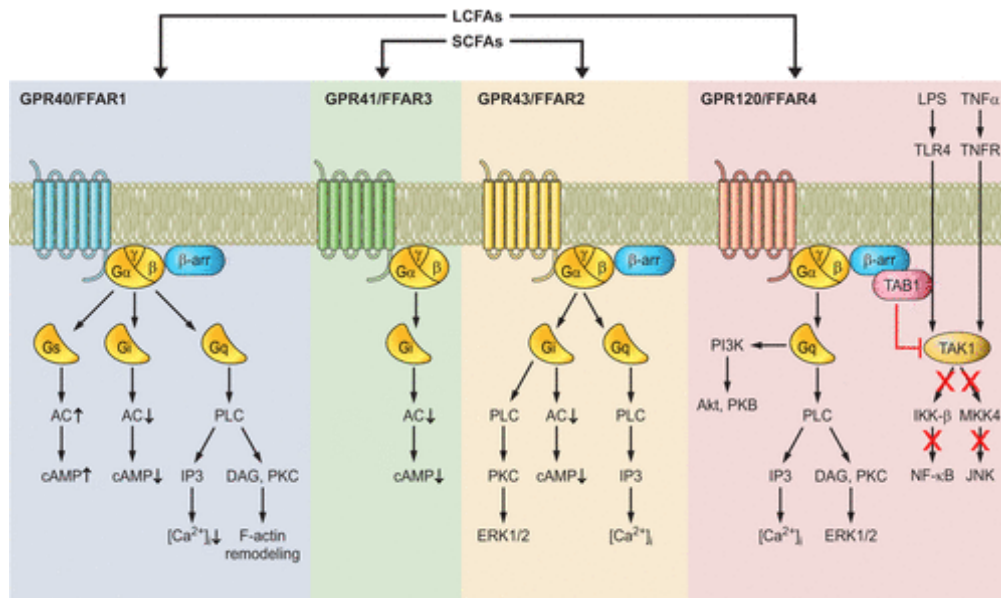


Figura 5. Especificidad del ligando y vías de señalización de los receptores de ácidos grasos libres (FFAR). Los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) activan GPR40/FFAR1 y GPR120/FFAR4, mientras que los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) activan GPR41/FFAR3 y GPR43/FFAR2. Se ilustran las vías de señalización corriente abajo de cada receptor. AC, adenilato ciclase; DAG, diacilglicerol; IP3, trifosfato de inositol; LPS, lipopolisacárido; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PKC, proteína cinasa C; PKD, proteína cinasa D; PLC, fosfolipasa C; TNF, factor de necrosis tumoral (tomado de Kimura et al., 2020).

Recientemente, ha surgido evidencia de que existe una expresión y la señalización de FFA1 y FFA4 en varias líneas celulares derivadas de cáncer de mama, que conlleva a la transactivación del EGFR y la desregulación de la vía PI3K/Akt/NF- κ B, así como la activación de vías que involucran a ERK1/2, Akt y Src. Como resultado, regulan distintos procesos oncogénicos como proliferación, migración, invasión, angiogénesis y resistencia a terapias (Figuras 6 y 7) (Karmokar y Moniri, 2022).

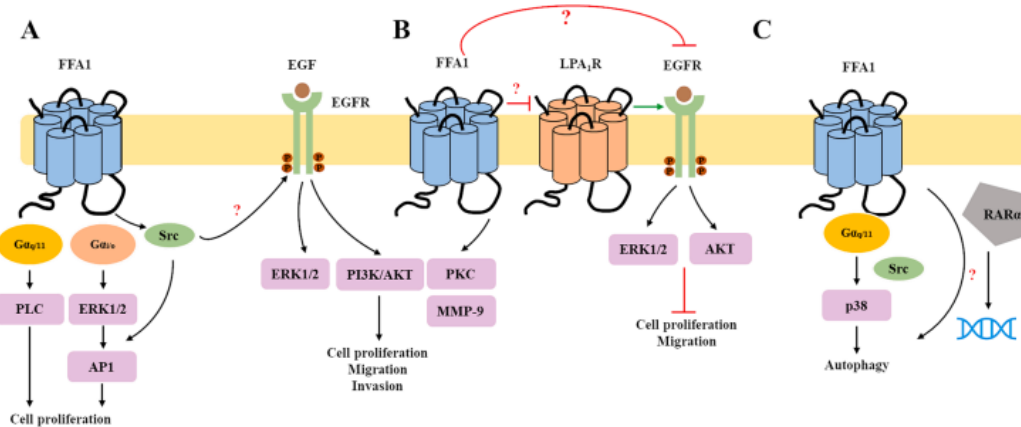


Figura 6. Papel de FFA1 en la proliferación, migración, invasión y autofagia de células de cáncer de mama. (A) La activación de FFA1 estimula la proliferación a través de la señalización $G\alpha q/11/PLC/Ca^{2+}$, $G\alpha i/o/ERK1/2/AP1$ y la transactivación de EGF/PI3K/Akt dependiente de Src. (B) La migración y la invasión de células de cáncer de mama a través de FFA1 implican señales para ERK1/2, PI3K/Akt, PKC y MMP-9, mientras que otros estudios sugieren que FFA1 puede inhibir la transactivación de LPAR y EGFR para inhibir la migración y proliferación. (C) FFA1 media la fosforilación de p38 y la activación de las proteínas autofágicas LC3II/ β -actina en un proceso que depende del receptor de ácido retinoico RAR α (tomada de Karmokar y Moniri, 2022).

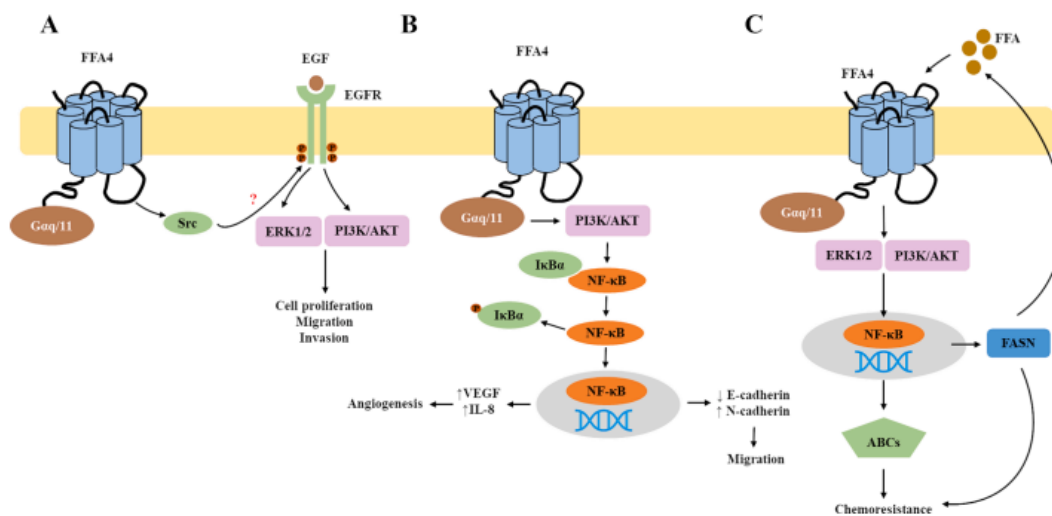


Figura 7. Papel de FFA4 en la proliferación, migración, invasión y resistencia a la quimioterapia de células de cáncer de mama. (A) FFA4 promueve la proliferación,

migración e invasión celular a través de la transactivación de EGFR mediada por Src y la señalización de ERK1/2 y PI3K/Akt. (B) FFA4 promueve la angiogénesis a través de la señalización PI3K/Akt y la actividad de NF- κ B, que aumenta la expresión de VEGF e IL-8. (C) FFA4 modula la quimiorresistencia a través de la señalización PI3K/Akt/NF- κ B, aumentando los transportadores ABC que promueven la salida de medicamentos quimioterapéuticos e impulsa la síntesis de FFA de novo (tomada de Karmokar y Moniri, 2022).

1.2.3. Ácidos grasos en cáncer

La composición de PUFAs en membranas plasmáticas dependen del consumo dietético. El consumo de una proporción de PUFAs ω -6/ ω -3 baja se considera importante para reducir la inflamación, el cual es un factor para el desarrollo de muchas enfermedades crónicas. Se recomienda el consumo de una proporción 4:1 de ω -6/ ω -3, sin embargo, la proporción de este consumo es 15:1 en las dietas occidentales, lo cual se ha relacionado con un incremento en la incidencia de cáncer de mama y próstata en inmigrantes asiáticos en Estados Unidos. De manera inversa, estudios recientes indican que una proporción alta en el consumo de ω -3/ ω -6 se asocia con un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en países asiáticos comparado con países occidentales (Bojková et al., 2020).

Los PUFAs son oxidados por enzimas ciclooxigenasas, lipooxigenasas y encimas de citocromo P450, generando oxilipinas como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, hidroxiácidos grasos y lipoxinas. Las oxilipinas generadas de PUFAs ω -6 tienen mayor actividad inflamatoria, angiogénica y proliferativa que las oxilipinas generadas de PUFAs ω -3. El ácido araquidónico (AA) y el ácido eicosapentanoico (EPA) representan los compuestos parentales de las oxilipinas ω -6 y ω -3 respectivamente. La producción de oxilipinas inicia con un aumento de calcio intercelular, que lleva a la traslocación de la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2) a la membrana celular, donde libera PUFAs de fosfolípidos de la posición sn-2 (Liput et al., 2021). Entre estos productos, la prostaglandina E2 activa la vía de señalización RAS-ERK y se ha relacionado con la migración, proliferación

y soporte en cáncer de mama, así como en las interacciones tumor-hospedero (Mentoor et al., 2019).

Los efectos de PUFAs ω -6 se relacionan con las funciones asociadas a sus metabolitos eicosanoides; el incremento de ácidos grasos ω -6 en la dieta occidental, provoca un aumento en estos metabolitos derivados del AA comparado a los metabolitos derivados de ácidos grasos ω -3 (Bojková et al., 2020).

1.2.4. Ácido Linoleico

El ácido linoleico (18:2 ω -6; *cis*-9,12-octadecadienoico) es el PUFA más abundante en la dieta humana. Su consumo típico en Estados Unidos corresponde aproximadamente al 6% de la ingesta energética total, 12 g/día y 17 g/día para hombres y mujeres respectivamente (Whelan y Fritsche, 2013). El AL representa el 75% de ácidos grasos en aceite de cártamo y 50-55% en aceite de maíz, semilla de algodón, girasol y soya; en el aceite de oliva representa el 3.5-21% de ácidos grasos. Es un ácido graso esencial, que constituye ceramidas que mantienen la integridad de la piel; sin embargo, sólo se necesita un consumo del 1% de la ingesta energética para evitar su deficiencia, la mayoría de las dietas presentan un consumo mucho mayor (Tsimidou et al., 2003; Calder, 2015).

El ácido linoleico puede metabolizarse y dar paso al ácido gamma-linoleico (GLA), ácido dihomo-gamma-linoleico (DGLA) y al ácido araquidónico (AA), que a su vez es metabolizado para generar eicosanoides, que entre otros efectos, promueven la progresión tumoral (Szczyko et al., 2020). Se ha reportado que en estudios *in vivo*, el AL dietario aumenta el crecimiento tumoral provocado por la exposición a un carcinógeno, y que los aceites basados en ácido linoleico promueven el cáncer de mama en ratas (Jandacek, 2017).

1.3. Vía ácido araquidónico en cáncer

El ácido araquidónico es metabolizado por distintas enzimas para generar productos eicosanoides. Las enzimas del citocromo P450 producen ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y 20-hidroxeicosatetraenoicos (HETE), las lipooxigenasas 5, 8, 12 y 15 producen ácidos HPETE y lipoxinas. Las

ciclooxigenasas 1 y 2 ciclooxigenasas (COX, también llamadas sintetasas de prostaglandina G/H) producen prostaglandinas (PGE2, PGI2, PGD2, PGF2) y tromboxanos (TX2) (Szczuko et al., 2020). Estos metabolitos tienen tanto funciones fisiológicas en la regulación de la respuesta inmune, agregación plaquetaria, contracción muscular y función renal, como funciones patológicas en el dolor y la inflamación, proliferación tumoral y progresión del cáncer (Calder, 2015). Específicamente PGE2, tiene un gran potencial tumorigénico y metastásico, ya que inhibe la apoptosis en células de cáncer e incrementa su capacidad invasiva. PGE2 actúa a través de sus receptores EP1-4, los cuales son GPCRs, capaces de activar la vía de señalización PKA/ERK y transactivar a EGFR, promoviendo la migración celular y metástasis. Además, se ha reportado una sobreexpresión de EP2 en tejidos de cáncer mamario (Wang et al., 2021).

1.3.1. Ciclooxigenasa

Las ciclooxigenasas 1 y 2 son constitutiva e inducible respectivamente. Ambas ciclooxigenan el ácido araquidónico, convirtiéndolo en prostaglandina G2 (PGG2) y una posterior peroxidación para la formación de PGH2. La ciclooxigenasa-1 (COX-1/PGHS1) se conforma de 576 aminoácidos, y la ciclooxigenasa-2 (COX-2/PGHS2) de 587 aminoácidos. Son homodímeros funcionales y estructurales, cada monómero consiste en un dominio de factor de crecimiento epidermal (EGF) en el extremo N-terminal, un dominio de unión a membrana (MBD) y un extremo C-terminal globular catalítico. Ambas presentan glicosilaciones; en el caso de COX-1 las N-glicosilaciones son necesarias para su plegamiento. Sus principales diferencias son que el sitio catalítico de COX-2 es más grande que el de COX-1, y que COX-1 presenta un alosterismo negativo a bajas concentraciones de AA, casos en los que COX-2 es más eficiente en su conversión mientras que, a altas concentraciones, la síntesis de prostanoides se favorece por COX-1. COX-1 es constitutiva y participa en procesos fisiológicos, mientras que COX-2 es inducible y media respuestas al estrés fisiológico. COX-1 se expresa en niveles altos en células endoteliales, monocitos, plaquetas y en células de los túbulos colectores y vesículas seminales. La expresión de COX-2 se induce por factores del crecimiento y

mediadores de la inflamación como IL-1, TNF α , LPS y 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA); mientras que glucocorticoides y citocinas proinflamatorias suprimen su expresión (Smith et al., 2000).

La actividad de COX-1 se ha visto vinculada con el desarrollo de cáncer de mama. Se ha reportado que el tratamiento de líneas celulares de cáncer de mama con un inhibidor de COX-1 disminuyen el crecimiento celular; además, estudios de tejidos tumorales en pacientes premenopáusicas mostraron niveles más altos de mRNA de COX-1 en tejidos tumorales malignos, comparado con tejido normal (Fahlén et al., 2017).

1.4. Vesículas Extracelulares

El microambiente tumoral es un elemento clave en el desarrollo del cáncer, en el cual el secretoma celular se encuentra alterado tanto en células de cáncer como en células del estroma. En este aspecto, las vesículas extracelulares (VEs) forman parte de la comunicación intercelular. Las VEs son secretadas por las células, encapsulando contenido celular en una doble membrana lipídica. Esta secreción es constitutiva; sin embargo, puede inducirse cambios en esta secreción por algún estímulo. En el medio extracelular, estas vesículas entran en contacto con otras células o componentes de la matriz extracelular y pueden provocar cambios biológicos y funcionales. Las VEs son el único medio que permite el intercambio celular de reguladores biológicos secretables y no secretables como RNAs, DNA y proteínas membranales, ya que protegen la integridad de estas macromoléculas y permiten su captura por células específicas (Choi et al., 2017).

1.4.1. Clasificación

Se han definido tres clases principales de VEs con base en su tamaño y biogénesis: exosomas (30 a 150 nm), microvesículas (MV, 200 a 2000 nm) y cuerpos apoptóticos (ApoBs, 400–2500 nm) (Cuadro 2). Los exosomas se generan a partir de cuerpos multivesiculares (MVBs), que posteriormente se fusionan con la membrana plasmática, así sus vesículas intraluminales (ILV) pasan al espacio extracelular, las cuales una vez liberadas se denominan exosomas. Las MVs se

forman a partir de la escisión directa de la membrana plasmática hacia el exterior, liberando así contenido citoplasmático envuelto por una membrana, proceso conocido como ectocitosis (Wang y Gires, 2019).

Cuadro 2. Características biológicas, aislamiento e identificación de diferentes vesículas extracelulares.

Características	Exosomas	Microvesículas (MV)	Cuerpos apoptóticos
Células parentales	Células vivas/estimuladas	Células vivas/estimuladas	Células apoptóticas
Origen biogénico	MVBs	Membrana plasmática	Membrana plasmática
Maquinaria molecular para biogénesis	Vía endosomal, fusión de MVBs con la membrana plasmática	Brote de la membrana plasmática seguido por fisión	Brotos de la membrana plasmática
Tamaño (nm)	30-150	200-2000	400-2500
Cargos moleculares	Proteínas, moléculas asociadas a balsas lipídicas, mRNA, miRs, mtDNAs, ncRNAs, metabolitos	Ácidos nucleicos, lípidos, proteínas son péptido señal	Fracciones nucleares, organelos celulares
Aislamiento	Ultracentrifugación (100,000 g) Kit comercial de precipitación Perlas inmunomagnéticas	Ultracentrifugación (10,000 g)	/

Marcadores asociados	CD63, CD81, TyA, C1q CD82, CD9, Alix, Anexina
-----------------------------	---

Tomada de Wang y Gires, 2019.

1.4.2. Biogénesis

En el proceso de formación de MVs, diferentes estímulos modifican la actividad de enzimas como la esfingomielinasa ácida (ASMasa), flipasa, flopasa y escramblasa (TMEM16F) que regulan la asimetría y contenido lipídico de la membrana plasmática, y provocan la escisión de la membrana y la liberación de MVs; además, estructuras como protuberancias ameboides, invadopodios o cilios, pueden dar lugar a la formación de vesículas mediante mecanismos de absición y liberación (Choi et al., 2017). Las protuberancias no apoptóticas son frecuentes en células cancerosas agresivas, y tras un reordenamiento del citoesqueleto de actina en el cuello de escisión, se liberan MVs (Bebelman et al., 2018). Así mismo, en el proceso de biogénesis de las MVs son necesarios una serie de eventos como el movimiento asimétrico de fosfatidilserina, la curvatura de membrana, la redistribución de cargas moleculares y la escisión de MV mediada por el factor de ribosilación de ADP GTPasa 6 (ARF-6) (Wang y Gires, 2019).

La formación de exosomas se da a partir del proceso de endocitosis y la formación de ILV dentro de endosomas, formando así los MVBs, que tras fusionarse a la membrana plasmática dan lugar a la liberación de exosomas (Choi et al., 2017). En este proceso participan complejos moleculares como el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT), Rab GTPasas (especialmente Rab11, Rab27 y Rab35), la proteína vacuolar clasificadora 4 homólogo A (VPS4A), una ATPasa de tipo AAA, la esfingomielinasa generadora de ceramida y el sistema del receptor de la proteína de fijación del factor sensible a la N-etilmaleimida soluble (SNARE) para la liberación de exosomas; se han asociado SNAP23, Sintaxina-4 y VAMP7 en células tumorales (Wang y Gires, 2019). Los MVBs destinados a la secreción son transportados por microtúbulos por la cinesina motora molecular regulada por Arl8 y por complejos dependientes de RAB7. RAB27 controla el

acoplamiento de MVBs a la membrana plasmática en varias líneas de células. Además, existen procesos que determinan cargos selectivos en los exosomas; por ejemplo, la actividad de heparanasa provoca la agrupación de sindecán, estimulando así la clasificación endosomal mediada por sintenina-ALIX-ESCRT, regulada por ARF-6 y su proteína efectora fosfolipasa D2 (PLD2), dando lugar a la producción de exosomas que contienen CD63, pero no CD81, flotillina y CD9. Así mismo, la ISGilación de Tsg101 estimula la fusión de MVB con lisosomas, disminuyendo la liberación de exosomas (Figura 8) (Bebelman et al., 2018).

Finalmente, los cuerpos apoptóticos se forman en el curso de la lesión celular y la muerte por apoptosis (Choi et al., 2017).

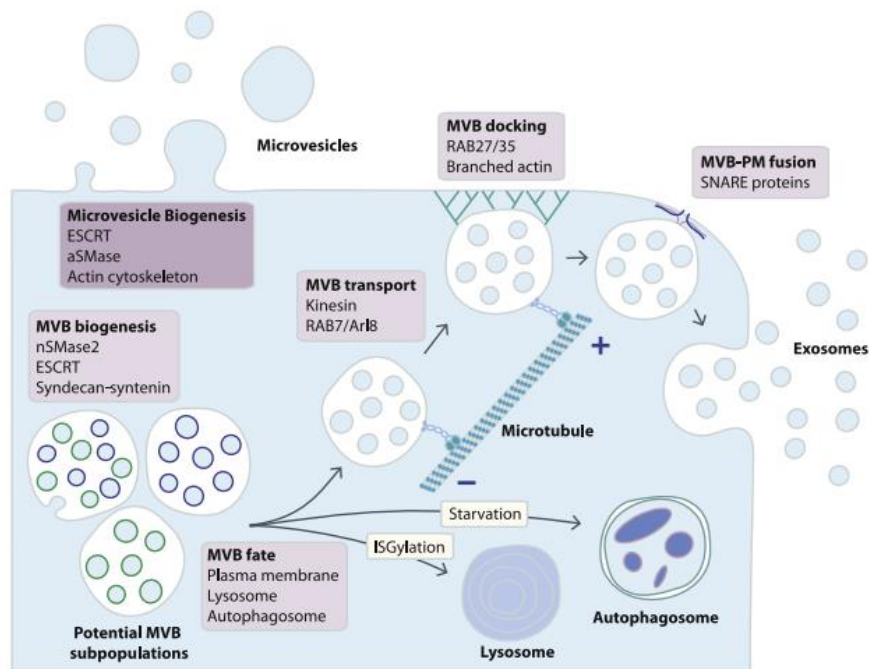


Figura 8. Vías de biogénesis de exosomas y microvesículas. Las microvesículas brotan directamente de la membrana plasmática, mientras que los exosomas se generan a partir de MVB que se fusionan con la membrana plasmática. Las vías alternativas de MVB incluyen la fusión con lisosomas o con autofagosomas. Los MVB son transportados sobre microtúbulos, posteriormente se acoplan a la membrana plasmática y se fusionan mediante el complejo SNARE, liberando así los exosomas (tomado de Bebelman et al., 2018).

1.4.3. Cargo

El contenido de las vesículas extracelulares varía con respecto al modo de biogénesis, el tipo de célula, estímulos y las condiciones fisiológicas. Todas las VEs contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Figura 9) (Colombo et al., 2014). Las proteínas que comúnmente se presentan en las VEs son las que se asocian a la biogénesis de las mismas. Además, las VEs contienen proteínas implicadas en la transducción de señales (EGFR), la presentación de antígenos (MHC I y MHC II) y otras proteínas transmembranales (LAMP1, TfR) (Abels and Breakefield, 2016). Los exosomas generalmente contienen proteínas endosomales, citosólicas y membranales, mientras que las proteínas nucleares, mitocondriales, del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi están ausentes en su mayoría (Colombo et al., 2014).

Los lípidos enriquecidos en VEs incluyen esfingomiélin, colesterol, gangliósido GM3, lípidos disaturados, fosfatidilserina y ceramida. El aumento de fosfatidilserina puede facilitar la captación de VEs por la célula receptora. Por el contrario, la fosfatidilcolina y el diacilglicerol se presentan en menor proporción comparados con la composición de la membrana de la célula secretora (Abels y Breakefield, 2016).

En las VEs se encuentra una composición diversa de material genético. En un pequeño número de casos, se ha encontrado DNA genómico y mitocondrial; pero en general, los RNAs como mRNA, miRNAs, rRNAs, y ncRNA se encuentran enriquecidos. Además, algunos RNAs se asocian de forma estable a ribonucleoproteínas (RNP) como argonauta 2 (AGO2). Es relevante destacar que estos RNAs pueden alterar la expresión génica de las células receptoras, aún si estas se encuentran en sitios distantes de las células secretoras (Colombo et al., 2014).

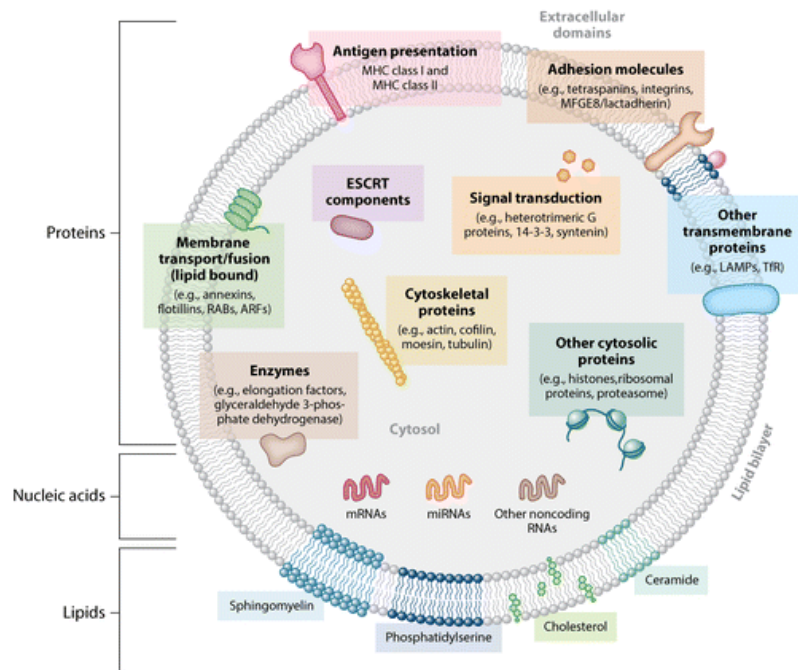


Figura 9. Moléculas cargo de las vesículas extracelulares (tomado de Colombo et al., 2014).

1.4.4. Captura

La captura de VEs puede llevarse a cabo mediante distintos mecanismos como la fusión de membranas, endocitosis mediada por proteoglicano de sulfato de heparina (HSPG), macropinocitosis o fagocitosis (Figura 10). En el caso de las VEs asociadas a cáncer, las integrinas que interactúan con células estromales y su matriz extracelular en el proceso de metástasis a órganos específicos (Choi et al., 2017).

Las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81) y otras moléculas de las VEs como PDL1, FASL99 y el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL o TNFSF10) inicia la unión a la célula receptora y activan sus receptores de señalización intracelular. Así mismo, la internalización de VEs dependiente de caveola, clatrina y balsas lipídicas parece ser independiente de ligandos de VEs. La macropinocitosis es un mecanismo de captura en el cáncer, algunos ligandos en VEs que la activan se unen al EGFR y permiten la captación inespecífica de VEs y material extracelular, que posteriormente se libera al espacio citosólico y altera el fenotipo de la célula (Möller y Lobb, 2020).

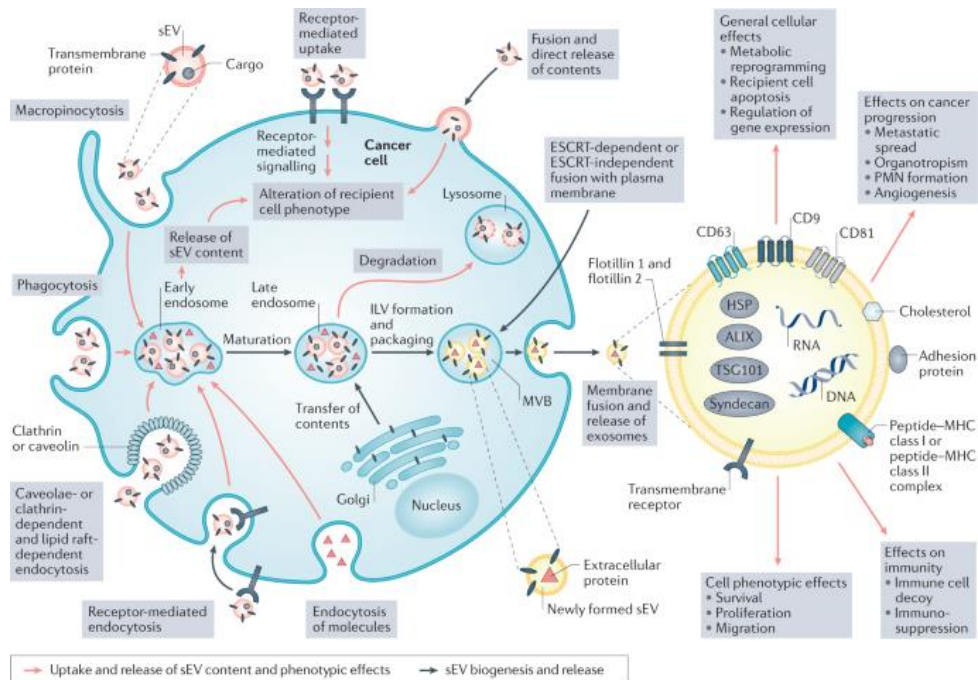


Figura 10. Captación de vesículas extracelulares pequeñas, biogénesis, contenido de carga y efectos biológicos (tomada de Möller y Lobb, 2020).

1.4.5. VEs en cáncer de mama

Las células de cáncer sufren cambios en la liberación, captación y actividad de las VEs. Con frecuencia se detecta un mayor número de VEs circulantes en el plasma de pacientes con cáncer. Las VEs se han relacionado con procesos necesarios para la progresión del cáncer como proliferación celular, remodelación de la matriz extracelular, angiogénesis, invasión, remodelación del nicho premetastásico, evasión del sistema inmune, quimioresistencia o regulación colectiva del crecimiento tumoral (Figura 11) (Wang y Gires, 2019). Las células tumorales también secretan VEs que contienen metaloproteinasas, las cuales ayudan a la migración de células tumorales en tejidos sólidos (Colombo et al., 2014).

La transferencia horizontal del oncogén EGFRvIII constitutivamente activo a través de VEs activa la señalización de VEGF en las células endoteliales, estimulando la angiogénesis tumoral. Las VEs tumorales pueden inhibir la proliferación y la activación de las células CD8+ y promover la expansión de las células T reguladoras, además pueden "educar" a los componentes inmunitarios innatos hacia un fenotipo protumorigénico. Hsp72 en la superficie de las VEs activan

las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) mediante la vía IL-6/Stat3. MiR-105 secretado por las células de cáncer de mama en VEs induce fugas vasculares en órganos distantes, mientras que miR-122 inhibe la captación de glucosa por las células del estroma, lo que aumenta la disponibilidad de glucosa y el crecimiento metastásico. La progresión del cáncer puede interrumpir la barrera de los macrófagos, lo que permite que las VEs del cáncer difundan a los ganglios linfáticos. La función protumoral de las VEs de origen estromal suele estar dictada por la exposición a señales derivadas del cáncer. Además, las VEs de células de cáncer de mama agresivas aumentan el potencial metastásico de las células tumorales menos malignas (Bebelman et al., 2018).

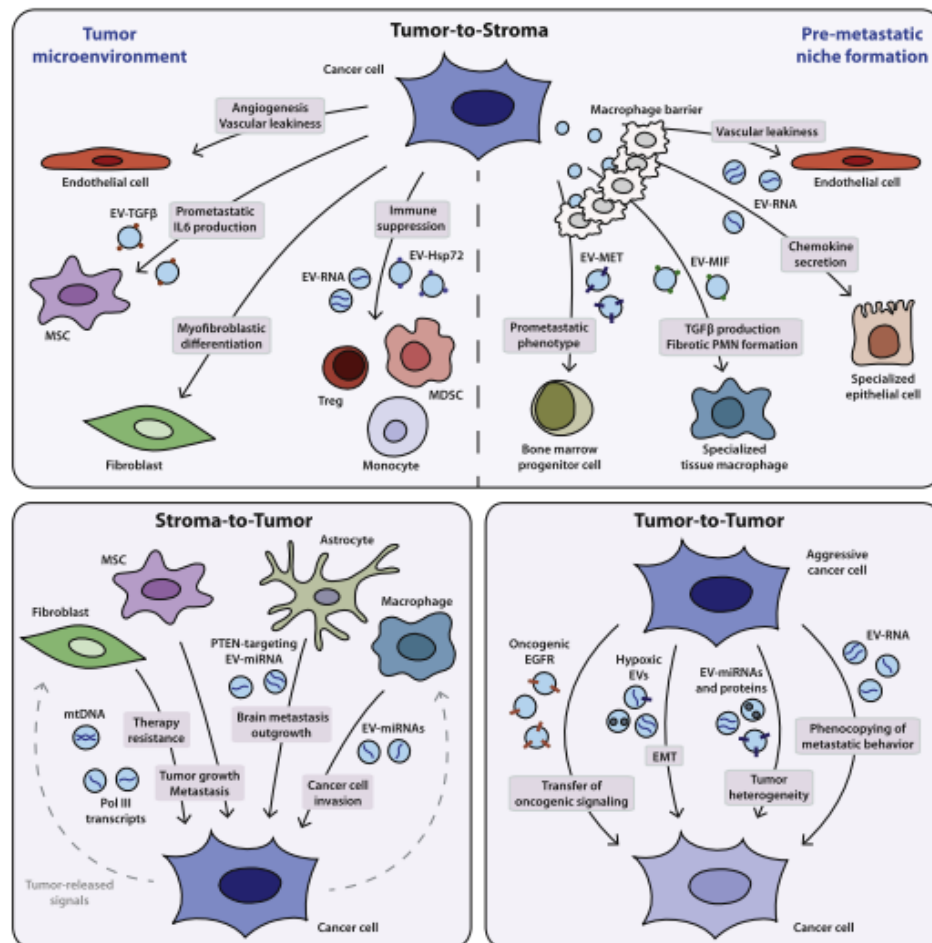


Figura 11. Función de las VEs en la comunicación de tumor a estroma, de estroma a tumor y de tumor a tumor que impulsa la progresión del cáncer. Las VEs liberadas por las células cancerosas pueden inducir a diferentes tipos de células del estroma

hacia un fenotipo proangiogénico, prometastásico e inmunosupresor. Además, las VEs del cáncer participan en la formación de nichos premetastásicos alterando el comportamiento de los progenitores derivados de la médula ósea o de las células especializadas residentes. Las VEs derivadas de células estromales pueden inducir el crecimiento de células cancerosas, el comportamiento invasivo y el desarrollo de resistencia a la terapia. Finalmente, las VEs de cáncer pueden transferir rasgos malignos entre subpoblaciones de células tumorales y propagar la heterogeneidad del tumor (tomada de Bebelman et al., 2018).

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor mortalidad en mujeres, siendo el subtipo TNBC es el más agresivo. En la progresión tumoral, la migración e invasión dan lugar a la diseminación de las células de cáncer a órganos distantes, formando así tumores metastásicos. En estos procesos, las VEs son un medio de comunicación celular que promueven cada aspecto de la cascada metastásica. El alto consumo de ácidos grasos es un factor de riesgo que promueve la progresión tumoral, no obstante, sus mecanismos moleculares no han sido completamente dilucidados. Previamente, nuestro grupo de investigación reportó que el ácido linoleico induce migración e invasión en células cancerosas mamarias TNBC (MDA-MB-231), a través de la activación del receptor FFAR4, la transactivación de EGFR y la señalización de PI3K/Akt (Serna-Marquez et al., 2017). Además, la inhibición de la actividad de COX-2 inhibe parcialmente estos procesos (Serna-Marquez et al., 2013). Así mismo, el ácido linoleico induce la secreción de VEs en células MDA-MB-231, que promueven la transición epitelio-mesénquima en células MCF10A, y estimulan de forma autocrina la migración e invasión en células MDA-MB-231 (Galindo-Hernandez et al., 2014; Leal-Orta et al., 2019; Ramirez-Ricardo et al., 2021). Sin embargo, no se ha descrito el papel de COX-1 en formación de cargos de estas vesículas extracelulares, y su efecto en la migración y metástasis de células de cáncer de mama.

3. HIPÓTESIS

COX-1 modula la secreción/cargo de vesículas extracelulares en células de cáncer de mama estimuladas por ácido linoleico, que promueven los procesos de migración y metástasis.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

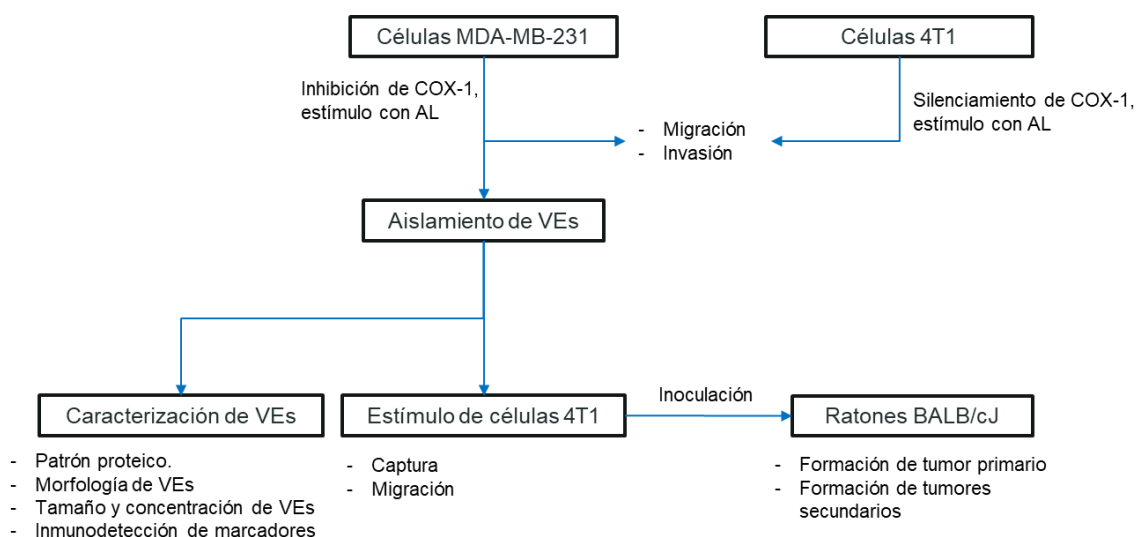
Evaluar la participación de la ciclooxigenasa-1 en la modulación del cargo y secreción de vesículas extracelulares que promueven los procesos de migración y metástasis, inducidas por ácido linoleico en células cancerosas mamarias.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar la participación de COX-1 en los procesos de migración e invasión en células de cáncer de mama TNBC.
- 2) Caracterizar las VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL e inhibidor de COX-1.
- 3) Determinar la capacidad de captura de VEs derivadas de MDA-MB-231 por células 4T1.
- 4) Estudiar los efectos de las VEs derivadas de células MDA-MB-231 en los procesos de migración en células 4T1.
- 5) Evaluar el papel de VEs de células MDA-MB-231 inducidas por AL e inhibiendo COX-1, en la formación de tumores primarios y metastásicos en un modelo murino de cáncer de mama.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño experimental



5.2. Materiales

El matrigel y el anticuerpo contra Flotilina-2 (Flot-2 Monoclonal de ratón; cat. 610383; 1:1,000) fueron adquiridos en BD Biosciences. El colorante para núcleo, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology, Inc. El anticuerpo contra CD81 (Monoclonal de ratón; cat. Sc-166029; 1:1,000) fue adquirido de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo fosfoespecífico para la Tyr-397 de FAK (anti-p-FAK; policlonal de conejo; cat. no. 44-624G; IF 1:100) y el colorante de membrana *CellMask™ Orange* fueron obtenidos de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Inc.). La faloidina conjugada a TRITC y la mitomicina C fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merck KGaA). El anticuerpo contra actina (cat. mAB8929) fue adquirido de R&D Systems. La solución fijadora Bouin fue adquirido de Sigma-Aldrich.

5.3. Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y 4T1 fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM y RPMI 1640 respectivamente, suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, anfotericina B

a concentración 2.5 µg/mL, vancomicina a concentración 25 µg/mL y amikacin a concentración 50 µg/mL antibióticos. Las células fueron incubadas a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂ y 95% de aire hasta alcanzar 80% de confluencia.

5.4. Estimulación con AL e inhibición de COX-1

Se utilizaron dos cajas Petri de 100 mm para cada condición experimental. Una vez que los cultivos celulares de la línea MDA-MB-231 alcanzaron confluencia de 80%, se sometieron a supresión con medio DMEM sin suero durante 14 horas. Posterior a este tiempo, los cultivos se lavaron dos veces con PBS estéril (NA₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, a pH 7.2). Una vez concluido este procedimiento, se les colocó medio fresco DMEM con los tratamientos correspondientes durante 48 horas. Estos tratamientos consistieron en un control sin estímulo (VEs control), AL a una concentración de 90 µM (VEs AL), inhibidor de COX-1 (FR122047) a una concentración de 500 nM (VEs FR12) o AL 90 µM e inhibidor FR122047 500 nM (VEs AL/FR12). Concluida la estimulación, se recuperaron los sobrenadantes y se procedió con la purificación de VEs.

5.5. Aislamiento de VEs derivadas de medios condicionados

Las VEs fueron aisladas por centrifugación diferencial como se reportó en (Escola et al., 1998). Brevemente, los medios condicionados, se sometieron a centrifugaciones consecutivas y en cada paso se recuperó el sobrenadante. En primer lugar, se centrifugó a 300 g durante 15 minutos, seguido de una centrifugación de 600 g durante 15 minutos, después una centrifugación de 2,000 g durante 15 minutos, posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 15,000 g durante 30 minutos y por último a 110,000 g durante 90 minutos, con lo cual se obtuvo la pastilla enriquecida con VEs. La pastilla se resuspendió en amortiguador RIPA o en medio RPMI 1640 con SFB al 0.5% y adicionado con antibióticosws.

5.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las VEs obtenidas de medios condicionados de células MDA-MB-231 fueron resuspendidas en 40 µL de PBS filtrado. Posteriormente se observaron por

microscopía electrónica como se ha reportado previamente (Ramirez-Ricardo et al., 2021). Brevemente, 10 μ L de suspensión de VEs fueron colocados y absorbidos durante 2 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 un par de segundos sobre una gota de acetato de uranilo al 2%, el exceso de fluido fue removido utilizando papel filtro, se repitió la exposición sobre una gota de acetato de uranilo al 2% durante 30 segundos y 2 minutos, y las rejillas se dejaron secar al aire libre. Finalmente, las rejillas fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1400) operado a 80 kV y acoplado a una cámara digital (Olympus SIS, Germany), el cual se encuentra en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) en CINVESTAV, unidad Zacatenco.

5.7. Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

El análisis de rastreo de nanopartículas se utilizó para evaluar la distribución del tamaño de las VEs provenientes en las fracciones obtenidas como se ha reportado previamente (Ramirez-Ricardo et al., 2021). Brevemente, las fracciones de VEs se resuspendieron en 100 μ L de PBS filtrado y se realizaron diluciones 1:100 para realizar el análisis mediante el equipo de NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd.), equipado con un láser de 488 nm y una cámara sCMOS. Se capturaron tres videos de cada muestra con una duración de 60 segundos y los datos se analizarán con el software NTA 3.0 (Malvern Instruments Ltd.). Este equipo se encuentra en la Central de Instrumentación en el departamento de Inmunología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

5.8. Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”

Se realizaron los ensayos de migración como se ha descrito previamente (Torres-Alamilla et al., 2023). Se utilizó una caja Petri de 35 mm para cada condición experimental. Una vez que los cultivos celulares MDA-MB-231 o 4T1 alcanzaron confluencia de 80%, éstas se sometieron a supresión con medio DMEM sin suero durante 14 horas o RPMI 1640 con 0.5% de SFB respectivamente. Las células fueron tratados con mitomicina C a concentración 12 μ M durante 2 horas, y

terminada la supresión, se realizó un corte sobre la monocapa celular utilizando una punta de pipeta estéril de 200 μ L, posteriormente los cultivos se lavaron dos veces con PBS estéril para remover las células suspendidas. A continuación, las células MDA-MB-231 fueron estimuladas durante 48 horas con AL 90 μ M e inhibidor de COX-1 (FR122047) 500 nM. Las células 4T1 Wild-type (WT), Scramble (Scr) y Knock-Down COX-1 (KD) se trataron con AL 60 μ M, o sólo la variante 4T1 WT se trató con las VEs derivadas de MDA-MB-231 (30 μ g VEs/condición) durante 24 horas. Terminado el tiempo de estímulo, las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta al 0.5%. La migración celular dentro de la herida será fotografiada usando un microscopio invertido acoplado a una cámara, y la cuantificación de células que migraron se realizó con el programa ImageJ 1.52p (NHI). Las células tratadas con SFB al 5% se incluirán como control positivo de invasión, así como células sin tratamiento como control negativo.

5.9. Ensayos de invasión en cámara de Boyden

Se realizaron los ensayos de migración como se ha descrito previamente (Torres-Alamilla et al., 2023). Los insertos de placas de 24 pozos (Costar, Corning Inc.) se cubrieron con 50 μ l de matrigel (10 μ g por pozo) y se incubaron a 37°C durante 24 h. A continuación, 1.0×10^5 células MDA-MB-231 en DMEM sin SFB o 2.5×10^5 células 4T1 WT, Scr o KD en RPMI-1640 con 0.5% suero, se colocarán sobre el matrigel de cada inserto. En la parte inferior de la cámara se colocaron los estímulos correspondientes en 600 μ l de medio de supresión. Las placas con los insertos se incubarán a 37°C durante 48 y 40 horas respectivamente, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire. Después de la incubación, se eliminaron las células que no invadieron y el matrigel en la parte superior de la membrana con un hisopo. Las células que invadieron se fijaron en la superficie inferior de la membrana durante 20 minutos con metanol. Se realizaron 2 lavados con PBS y se tiñeron con cristal violeta al 0.5%. Las células se fotografiaron y cuantificaron eluyendo el colorante con 750 μ l de ácido acético al 10%. La absorbancia de la solución obtenida se midió a 600 nm. Las células tratadas con

SFB al 5% se incluirán como control positivo de invasión, así como células sin tratamiento como control negativo.

5.10. Inmunodetección

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 12% y transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche al 5% durante 1 hora, para después colocar el anticuerpo primario correspondiente (dilución 1:1000) para su incubación durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.1% y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a HRP (dilución 1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.1% y se reveló mediante quimioluminiscencia (ECL). Las autorradiografías se escanearon (Galindo-Hernandez et al., 2014).

5.11. Ensayo de tinción y captura de VEs

Las VEs se obtuvieron según el protocolo de extracción. Para realizar el ensayo de captura se utilizó el protocolo previamente descrito (Galindo-Hernandez et al., 2014). La solución de tinción se preparó en un tubo Falcon cubierto con aluminio, colocando 1 μ L de solución lipofílica fluorescente *CellMask™ Orange Plasma Membrane Stain* (Invitrogen) en 1 mL de medio RPMI 1640 sin suero. A continuación, las VEs (30 μ g VEs/condición) se resuspendieron en 300 μ L de solución de tinción fresca *CellMask™ Orange Plasma membrane Stain*, los tubos se cubrieron con papel aluminio y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, la solución de cada condición se colocó en tubos para ultracentrifugación (BeckmanCoulter), los tubos se llenarán completamente con PBS 1X estéril. Finalmente se sometieron a centrifugación de 110,000 g durante 60 minutos. Las VEs se recuperaron e incubaron con las células 4T1 previamente sometidas a supresión con RPMI 1640 con SFB al 0.5% durante 4.5 horas. Finalizado el tiempo de incubación, a las células 4T1 se les retiró el medio, se despegaron con tripsina al 0.25%, se fijaron con p-formaldehído al 4% por 15

minutos y se lavaron con PBS tres veces, se resuspendieron en 300 μ L de PBS y se analizaron por citometría de flujo (BD LSRFortessa™ Cell Analyzer, equipo ubicado en LaNSE en CINVESTAV, unidad Zacatenco), en donde se registraron 20,000 eventos por condición. El análisis se realizó con Kaluza Analysis Software version 1.0. Para el caso del ensayo de captura realizado por microscopía confocal, una vez finalizado el tiempo de incubación, las células 4T1 fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, posteriormente se lavaron con PBS tres veces, serán contratiñeron con el colorante DAPI para la tinción de núcleo y finalmente se montaron sobre un portaobjeto usando Vectashield. Las muestras se analizaron por microscopía confocal (Leica Microsystems, Model DMI8, Wetzlar, Germany, equipo ubicado en el departamento de Biología Celular, CINVESTAV).

5.12. Metástasis *in vivo*

Para la experimentación *in vivo*, se utilizó un modelo experimental previamente descrito (Torres-Alamilla et al., 2023). Se agruparon ratones hembra Balb/cJ en cinco grupos de estudio, utilizando ocho ratones por grupo (40 ratones en total), como a continuación se describe. Grupos de estudio:

- Grupo Sin VEs: ratones con inoculación de células 4T1.
- Grupo VEs Control: ratones con inoculación de células 4T1 preestimuladas con VEs control.
- Grupo VEs AL: ratones con inoculación de células 4T1 con preestimuladas con VEs AL.
- Grupo VEs AL/FR12: ratones con inoculación de células 4T1 preestimuladas con VEs AL/FR12.
- Grupo VEs FR124: ratones con inoculación de células 4T1 preestimuladas con VEs AL/FR12.

Las células 4T1 se cultivaron en cajas Petri de 60 mm, y una vez alcanzada una confluencia del 80%, se sometieron a supresión con RPMI 1640 con 0.5% de SFB durante 5 horas; posteriormente de trataron con las fracciones de VEs durante 8 horas (30 μ g VEs/condición). Para la inoculación de las células 4T1 se prepararon suspensiones de celulares con 6×10^4 células/mL en medio RPMI 1640 libre de SFB.

La concentración de células se determinó usando un hematocitómetro. Dentro de un tiempo no mayor a 40 minutos después de haber preparado la suspensión celular, se inoculó ortotópicamente en la cuarta almohadilla de grasa mamaria inguinal izquierda a ratones hembra Balb/cJ de ocho semanas de edad 50 μ L de la suspensión celular (3000 células 4T1) de manera subcutánea. Para esto se utilizaron jeringas de tuberculina de 1 mL con una aguja de ½ pulgada calibre 26.

Después de haber realizado la eutanasia de los animales, se recolectó el tumor primario para la determinación de su peso y volumen. Así mismo, se recolectaron cerebro, hígado y pulmones, que fueron fijados en solución Bouin para el conteo macroscópico de los sitios de metástasis.

5.13. Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres experimentos (repeticiones biológicas) independientes para cada ensayo. Los datos se analizaron usando ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías y la prueba *pos hoc* de comparación múltiple de Tukey o Dunnet respectivamente, usando el software GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, EE.UU.). Todos los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE). La probabilidad estadística por debajo de $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) y $p \leq 0.0001$ (****) se consideraron estadísticamente significativas.

6. RESULTADOS

6.1. COX-1 participa en la migración e invasión inducida por AL en células TNBC.

Estudios previos en nuestro grupo de investigación han demostrado que el AL induce migración e invasión en la línea celular MDA-MB-231, a través de la activación de los receptores FFAR1 y FFAR4, y que COX-2 participa parcialmente en estos procesos (Serna-Marquez et al., 2013; Serna-Marquez et al., 2017; Diaz-Aragon et al., 2019). Considerando estos hallazgos, se evaluó la participación de COX-1 en los procesos de migración e invasión inducidos por AL en las líneas celulares TNBC MDA-MB-231 y 4T1. Para determinar la capacidad migratoria, se utilizó el método de rayadura. Los resultados muestran que como se ha descrito previamente, el AL induce la migración de las células MDA-MB-231; sin embargo, la inhibición de COX-1 suprime el efecto inducido por el AL (Figura 12).

MDA-MB-231

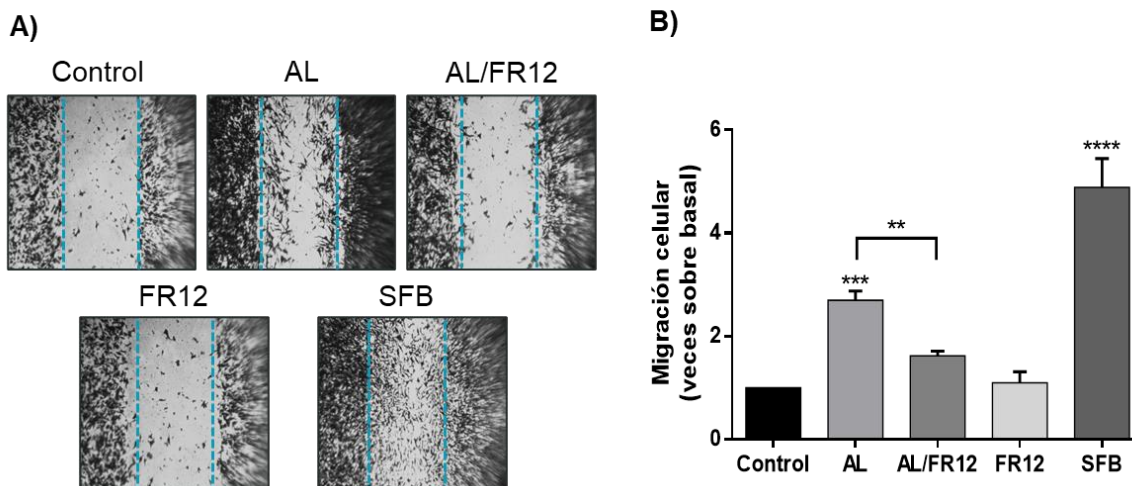


Figura 12. La inhibición de COX-1 disminuye la migración de las células MDA-MB-231 inducida por AL. La migración celular se analizó a través del método de rayadura, para lo cual células MDA-MB-231 fueron tratadas con AL 90 μ M y/o con FR122047 500 nM por 48 horas. **A)** Imagen representativa de tres experimentos independientes de método de rayadura. **B)** Análisis de la migración celular, el gráfico muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los datos se

analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. $**p \leq 0.001$, $***p \leq 0.0001$, $****p \leq 0.00001$.

En la línea celular 4T1, se realizó previamente un silenciamiento estable de COX-1 mediante la infección con partículas lentivirales con expresión de shRNAs dirigido a de COX-1 (knock-down COX-1, KD), además de utilizar un control de infección (Scramble, Scr); estas partículas lentivirales se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (cat. sc-29277-V, cat. sc-108080). El silenciamiento parcial de COX-1 se comprobó mediante inmunodetección (Figura 13).

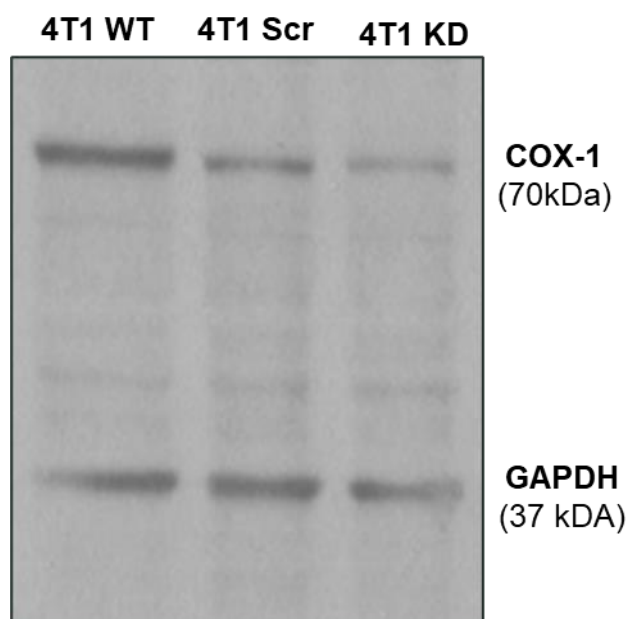


Figura 13. Silenciamiento de COX-1 en la línea celular 4T1. Inmunodetección de extractos proteicos totales de células 4T1 wild-type (WT), células 4T1 infectadas con partículas lentivirales con shRNA control (Scr), o células 4T1 infectadas con partículas lentivirales shRNA COX-1 (KD).

Posteriormente, se estimularon las distintas variantes de 4T1 con AL 60 μM y con SFB como control positivo; los datos se normalizaron contra la condición control (sin estímulo) de la variante wild-type (WT). El estímulo con AL logró inducir la migración celular en las variantes WT y Scr; sin embargo, en la variante KD no

se observó este efecto; por tanto, se observa que el silenciamiento parcial de COX-1 logra disminuir de manera significativa la migración inducida por AL (Figura 14).

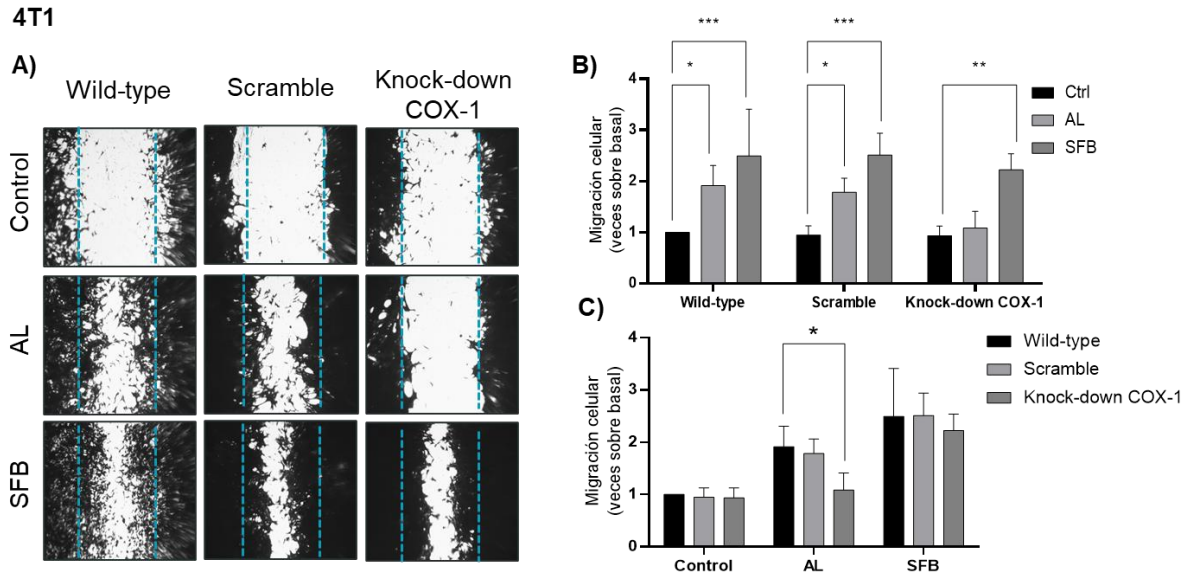


Figura 14. El silenciamiento de COX-1 disminuye la migración de las células 4T1 inducida por AL. La migración celular se analizó a través del método de rayadura, para lo cual células 4T1 wild-type, scramble o knock-down COX-1 fueron tratadas con AL 60 μM y fijadas después de 24 horas de estímulo. **A)** Imagen representativa de tres experimentos independientes de método de rayadura. **B)** Análisis de la migración celular, con comparación múltiple entre tratamientos. **C)** Análisis de la migración celular, con comparación múltiple entre variantes celulares. Los gráficos muestran la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$ *** $p \leq 0.0001$.

Para determinar la participación de COX-1 en el proceso de invasión inducido por AL, se utilizó el método de invasión en cámara de Boyden con matrigel. Para las células MDA-MB-231, se realizaron los estímulos previamente descritos con AL 90 μM y se inhibió COX-1 con FR122027 500 nM; los datos se normalizaron contra la condición control. Como se ha reportado previamente, el estímulo con AL induce la invasión celular de la línea MDA-MB-231; sin embargo, al tratar las células con el

inhibidor de COX-1 disminuye significativamente el efecto inducido por COX-1 (Figura 15).

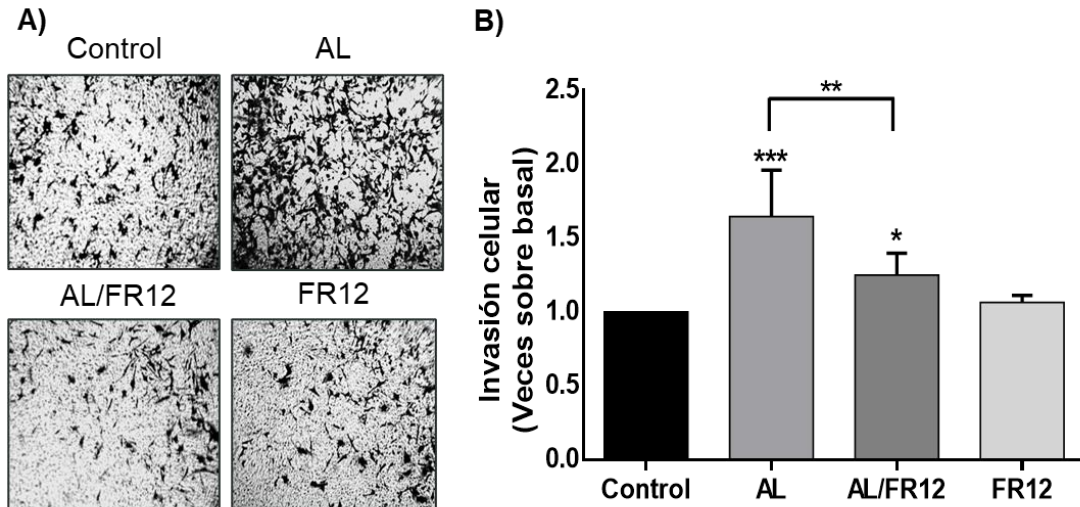


Figura 15. La inhibición de COX-1 disminuye la invasión de las células MDA-MB-231 inducida por AL. La invasión celular se analizó a través del método de invasión en cámara de Boyden, para lo cual células MDA-MB-231 fueron tratadas con AL 90 μM y/o con FR122047 500 nM por 48 horas. **A)** Imagen representativa de tres experimentos independientes. **B)** Análisis de la invasión celular, el gráfico muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. La comparación se realizó respecto al valor Control. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$.

Para la línea celular 4T1, cada una de las variantes se estimuló con AL 60 μM y con SFB como control positivo; los datos se normalizaron contra la condición control (sin estímulo) de la variante wild-type (WT). Los resultados muestran que el AL induce la invasión celular en células 4T1 WT y Scr; sin embargo, en células 4T1 KD no se observa este efecto. Por tanto, el silenciamiento parcial de COX-1 disminuye significativamente la invasión celular inducida por AL (Figura 16).

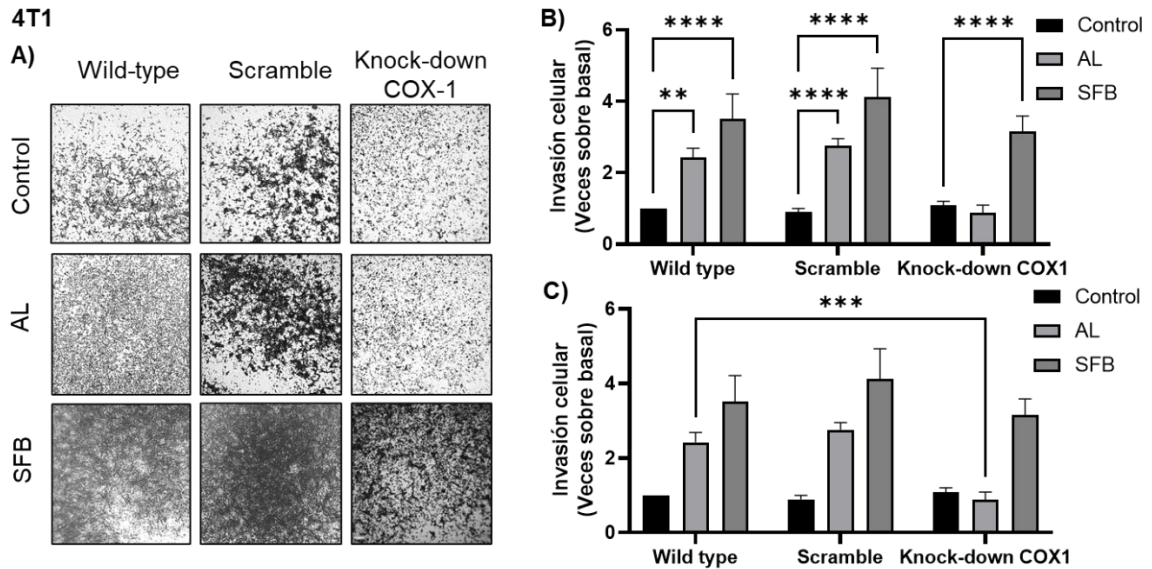


Figura 16. El silenciamiento de COX-1 disminuye la invasión de las células 4T1 inducida por AL. La invasión celular se analizó a través del método de invasión en cámara de Boyden, para lo cual células 4T1 wild-type, scramble o COX-1 KD fueron tratadas con AL 60 μ M y fijadas después de 40 horas de estímulo. **A)** Imagen representativa de tres experimentos independientes. **B)** Análisis de la invasión celular, con comparación múltiple entre tratamientos. **C)** Análisis de la invasión celular, con comparación múltiple entre variantes celulares. Los gráficos muestran la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet. $**p \leq 0.001$, $***p \leq 0.0001$, $****p \leq 0.00001$.

6.2. Caracterización de VEs derivadas de células MDA-MB-231 tratadas con AL e inhibidor de COX-1.

Las VEs son un medio de comunicación intercelular, que diversos estudios han señalado como un factor determinante en la progresión de distintos tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer de mama (Choi et al., 2017; Bebelman et al., 2018; Wang and Gires, 2019). Asimismo, en nuestro grupo de investigación se demostró que el AL induce la secreción de VEs que favorecen los procesos de migración e invasión de manera autócrina en la línea celular MDA-MB-231 (Ramirez-Ricardo et al., 2021). Considerando los resultados obtenidos al momento, se decidió evaluar el

papel de COX-1 en la secreción de VEs inducida por AL en la línea celular MDA-MB-231. Para ello, se procedió a la caracterización de VEs derivadas de células MDA-MB-231 sin tratamiento (VEs control), tratadas con AL (VEs AL), tratadas con AL e inhibidor de COX-1 (VEs AL/FR12) y tratadas sólo con inhibidor de COX-1 (VEs FR12). Primero, se analizó la morfología de las VEs aisladas por microscopía electrónica de transmisión (MET), donde se observaron poblaciones de VEs íntegras, con tamaños heterogéneos entre 100 nm y 200 nm, además de un fondo sin desechos celulares (Figura 17A). Además, se realizó una inmunodetección de las proteínas Flotilina-2 y CD81, las cuales son consideradas marcadores universales de VEs; en todas las condiciones las VEs fueron positivas para ambos marcadores (Figura 17B). Con estos resultados, aseguramos el correcto aislamiento de VEs a partir de medios condicionados.

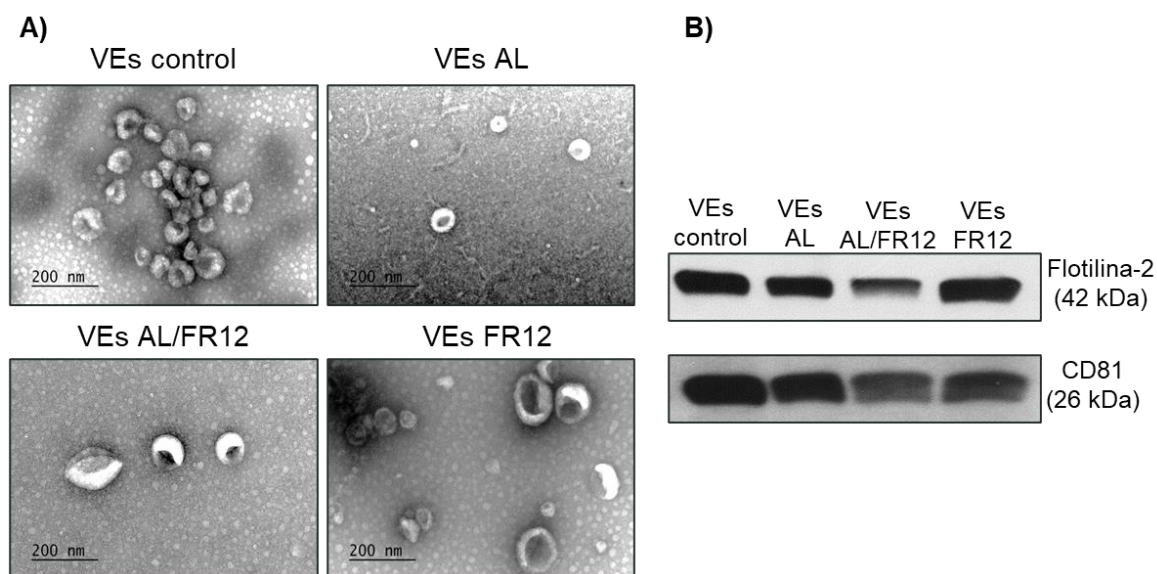


Figura 17. Caracterización de VEs derivadas de células MDA-MB-231. VEs de células MDA-MB-231 incubadas en medio DMEM sin suero (VEs Control), estimuladas con AL 90 μ M (VEs AL) y/o con FR122047 500 nM (VEs AL/FR12 y VEs FR12 respectivamente). **A)** Microscopía electrónica de transmisión (MET). **B)** Inmunodetección de Flotilina-2 y CD81 a partir de extractos proteicos de las VEs aisladas.

Posteriormente, para caracterizar las poblaciones de VEs secretadas por las células MDA-MB-231 con los distintos tratamientos, se realizó un análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). Este análisis mostró la variación en las poblaciones heterogéneas de VEs secretadas en cada condición, con tamaños variables entre 100 nm y los 828 nm (Figura 18A). Además, mostró que el AL induce un aumento significativo en la secreción de VEs, la cual no se ve afectada al utilizar el inhibidor de COX-1 (Figura 18B). En cuanto a la media de tamaños de las VEs, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones a pesar de la variación observada en las poblaciones de VEs secretadas (Figura 18C).

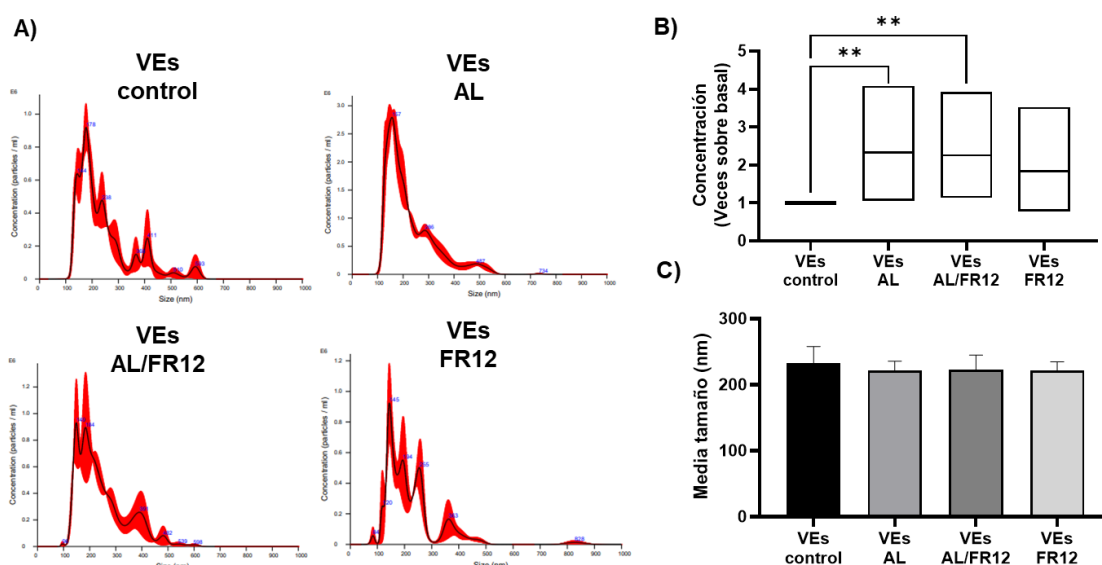


Figura 18. Análisis de rastreo de nanopartículas de VEs derivadas de células MDA-MB-231. VEs de células MDA-MB-231 incubadas en medio DMEM sin suero (VEs Control), estimuladas con AL 90 μ M (VEs AL) y/o con FR122047 500 nM (VEs AL/FR12 y VEs FR12 respectivamente). **A)** Histogramas representativos de tres experimentos independientes. **B)** Análisis de la concentración de VEs secretadas en cada condición; los datos se normalizaron contra la condición de VEs control. El gráfico muestra la media, el mínimo y máximo de cuatro experimentos independientes. **C)** Análisis de la media de tamaño de VEs secretadas en cada condición. El gráfico muestra la media \pm DE de cuatro experimentos independientes.

Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. $**p \leq 0.001$.

6.3. Las VEs derivadas de MDA-MB-231 con distintos tratamientos son capturadas por células 4T1 de forma diferencial.

Para determinar la capacidad de captura de las VEs derivadas de células MDA-MB-231 por las células 4T1, las VEs de distintas condiciones fueron teñidas con el colorante *CellMask™ Orange Plasma Membrane Stain*. A continuación, las células 4T1 se incubaron con las VEs teñidas durante 4.5 horas. Se determinó la intensidad media de fluorescencia de las células 4T1 tratadas con vesículas por citometría de flujo; adicionalmente, se observó la fluorescencia emitida por microscopía confocal. El análisis de captura por citometría de flujo muestra que las células 4T1 tratadas con las distintas VEs aumentan su intensidad media de fluorescencia comparado con los controles negativos de células 4T1 sin VEs o con VEs sin teñir, por tanto, son capaces de capturarlas (Figura 19A). Sin embargo, al normalizar la intensidad media de fluorescencia contra las células tratadas con VEs control y comparar entre grupos, los resultados mostraron que la captura de VEs AL es significativamente mayor comparada con la captura de VEs control, además la captura de VEs AL/FR12 es significativamente menor que la captura de VEs AL (Figura 19B). Por tanto, a partir de estos análisis determinamos que las células 4T1 capturan las VEs derivadas de MDA-MB-231 de forma diferencial, donde el AL provoca la secreción de VEs con mayor afinidad a las células 4T1, efecto que se abate al inhibir a COX-1.

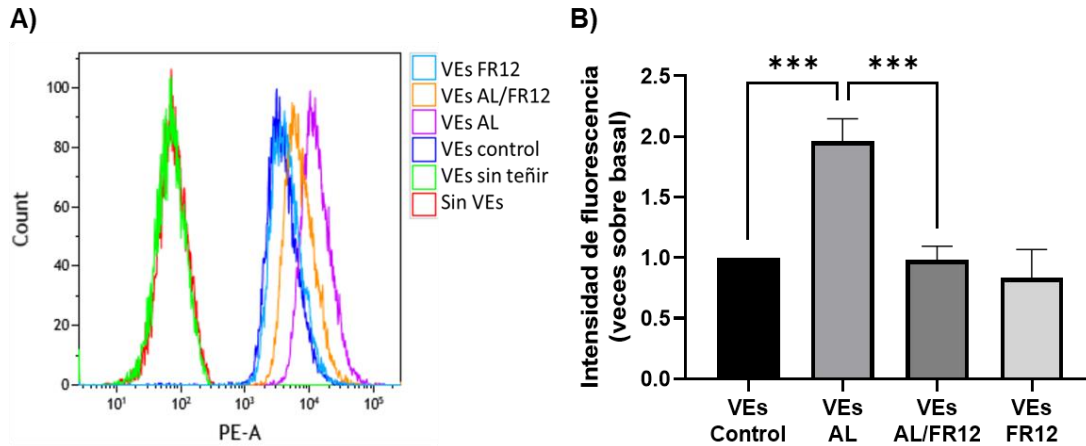


Figura 19. Las células 4T1 capturan las VEs derivadas de MDA-MB-231 con distintos tratamientos de forma diferencial. Las células 4T1 fueron incubadas por 4.5 horas con las VEs preteñidas con *CellMask™ Orange Plasma Membrane Stain* y analizadas por citometría de flujo. **A)** Histogramas representativos de tres experimentos independientes. **B)** Análisis de la captura de VEs representada por la intensidad media de fluorescencia, normalizada contra las células tratadas con VEs control teñidas. El gráfico muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. *** $p \leq 0.0001$.

Asimismo, la captura de las distintas VEs se observó por microscopía confocal a las 3 horas y a las 4.5 horas. En ambos casos se observó que las células 4T1 son capaces de captar las VEs derivadas de MDA-MB-231 con distintos tratamientos; sin embargo, a las 3 horas la marca fluorescente se observa principalmente en la región membranal de las células, mientras que a las 4.5 horas se observa en la zona perinuclear (Figura 20).

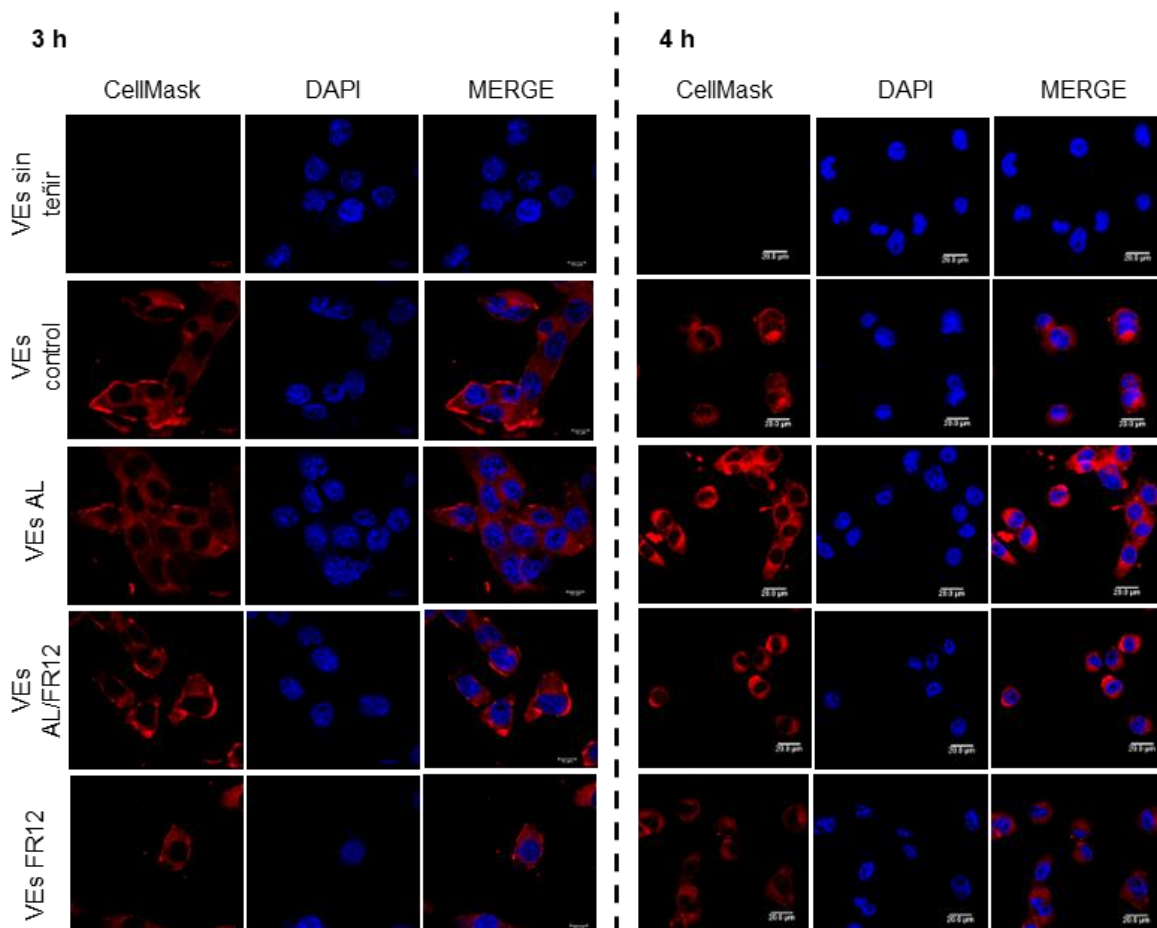


Figura 20. Las células 4T1 capturan las VEs derivadas de MDA-MB-231. Las células 4T1 fueron incubadas por 3 horas o 4.5 horas con las VEs preteñidas con *CellMask™ Orange Plasma Membrane Stain* y analizadas por microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con el colorante DAPI. **3 h:** Barra de escala = 10 μm . **4.5 h:** Barra de escala = 20 μm .

6.4. Las VEs de células MDA-MB-231 tratadas con AL inducen migración en células 4T1.

Tras comprobar que las células 4T1 son capaces de capturar las VEs de MDA-MB-231 (Figura 19 y 20), se procedió a evaluar su efecto en la migración de células 4T1, para lo cual se empleó el método de cierre de herida, normalizando los datos contra células sin estímulo (Sin VEs). Los resultados muestran que las células tratadas con VEs AL aumentaron significativamente su migración celular al comparar con la condición Sin VEs. Además, al inhibir COX-1 en células MDA-MB-

231 junto con el estímulo de AL, las vesículas secretadas (VEs AL/FR12) pierden la capacidad de inducir migración en células 4T1 (Figura 21).

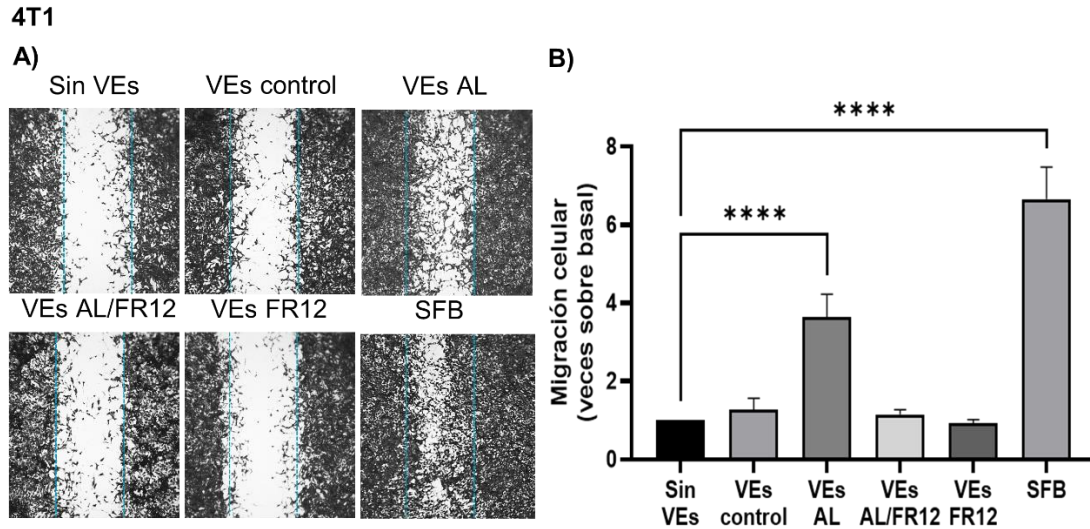


Figura 21. La inhibición de COX-1 en células MDA-MB-231 disminuye capacitación de VEs para inducir migración en células 4T1. La migración celular se analizó a través del método de rayadura para lo cual células 4T1 fueron tratadas con VEs control, VEs AL, VEs AL/FR12 o VEs FR12 por 24 horas. **A)** Imagen representativa de tres experimentos independientes de método de rayadura. **B)** Análisis de la migración celular, el gráfico muestra la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. **** $p \leq 0.00001$.

6.5. El pretratamiento de células 4T1 con VEs AL induce metástasis a pulmón e hígado.

La migración celular es un proceso esencial para la progresión del cáncer de mama, ya que es necesario que las células cancerosas migren hacia sitios distantes para la formación de tumores metastásicos (Fares et al., 2020). Debido a que nuestros resultados mostraron que sólo las VEs AL inducen migración en células 4T1, decidimos evaluar la capacidad metastásica de las células 4T1 tras ser estimuladas con VEs derivadas de células MDA-MB-231 con distintos tratamientos. Para ello, utilizamos un modelo murino de cáncer de mama. En este modelo, se

realizó la eutanasia a los ratones el día 21 posterior a la inoculación ortotópica con células 4T1, se recuperó el tumor primario, pulmones, hígado y cerebro, los cuales son los principales órganos blancos para metástasis en el cáncer de mama. Se determinó el número de macrometástasis superficiales en los órganos recolectados fijados en solución Bouin, las cuales se observan como nódulos blancos en un fondo amarillo.

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con VEs no aumentó el peso y volumen del tumor primario (Figura 22). Sin embargo, se observó que el número de ratones con metástasis en pulmón e hígado, así como el número de nódulos metastásicos en cada órgano por ratón, fue significativamente mayor en el grupo inoculado con células pretratadas con VEs AL, en tanto que el grupo de VEs AL/FR12, no presentó un aumento significativo (Figuras 23 y 24). En cuanto a la metástasis a cerebro, no se observó un aumento significativo en el número de ratones con metástasis, ni en el número de nódulos metastásicos en cerebro por ratón al pretratar las células inoculadas con VEs (Figura 25).

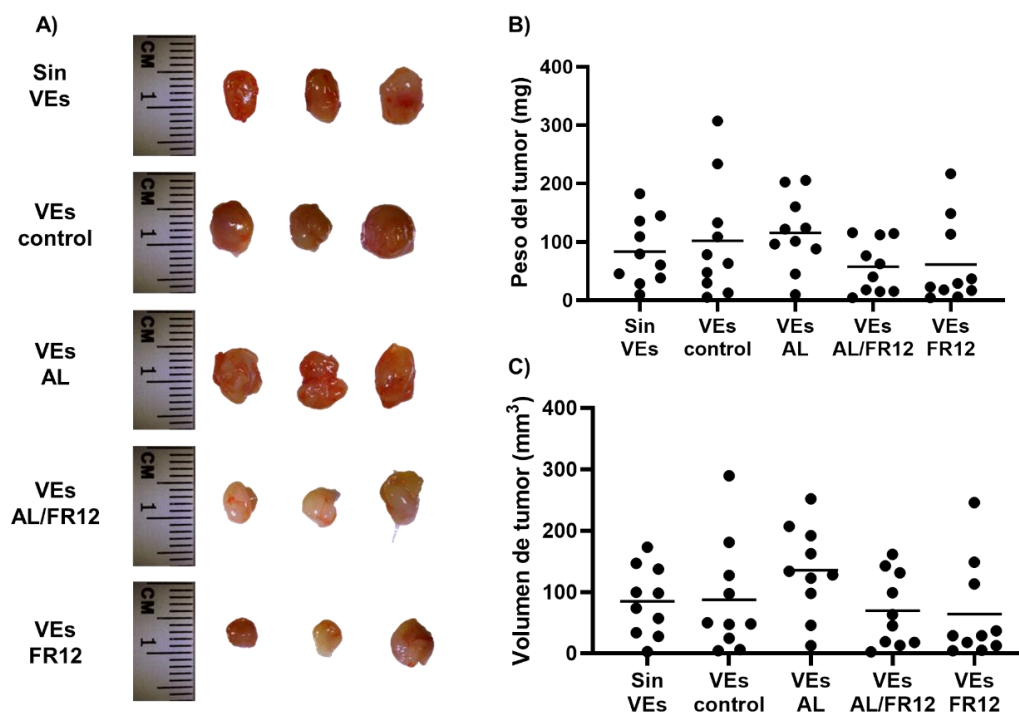


Figura 22. El pretratamiento de células 4T1 con VEs no provocó cambios en el peso y volumen de tumores primarios. Tumores primarios recuperados de ratones

Balb/cJ inoculados con células 4T1 pretratadas con VEs. **A)** Imagen representativa de tumores primarios de ratones de cada grupo experimental. **B)** Análisis del peso de tumores primarios. **C)** Análisis del volumen de tumores primarios. Los gráficos muestran la media y los valores individuales de los 10 ratones en cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía.

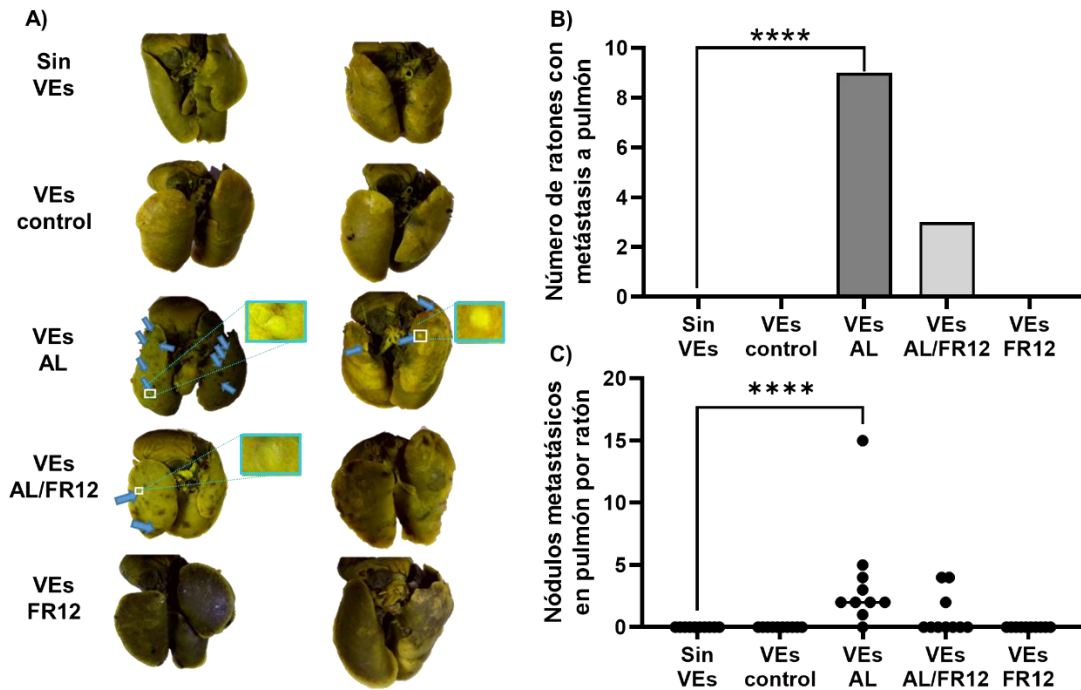


Figura 23. El pretratamiento de células 4T1 con VEs AL induce mayor metástasis a pulmón. Pulmones recuperados de ratones Balb/cJ inoculados con células 4T1 pretratadas con VEs. **A)** Imagen representativa de pulmones de ratones de cada grupo experimental, las flechas azules marcan nódulos metastásicos. **B)** Análisis del número de ratones con metástasis a pulmón. **C)** Análisis del número de nódulos metastásicos en pulmón por ratón. El gráfico muestra la media y los valores individuales en cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. **** $p \leq 0.00001$

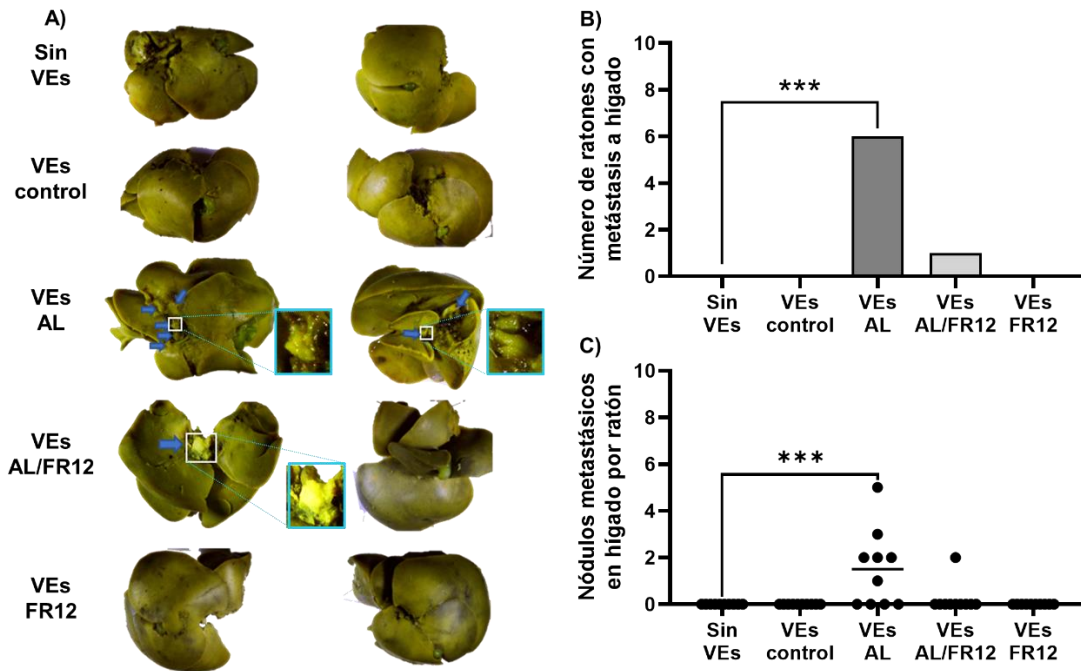


Figura 24. El pretratamiento de células 4T1 con VEs AL induce mayor metástasis a hígado. Hígados recuperados de ratones Balb/cJ inoculados con células 4T1 pretratadas con VEs. **A)** Imagen representativa de hígados de ratones de cada grupo experimental, las flechas azules marcan nódulos metastásicos. **B)** Análisis del número de ratones con metástasis a hígado. **C)** Análisis del número de nódulos metastásicos en hígado por ratón. El gráfico muestra la media y los valores individuales en cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. *** $p \leq 0.0001$

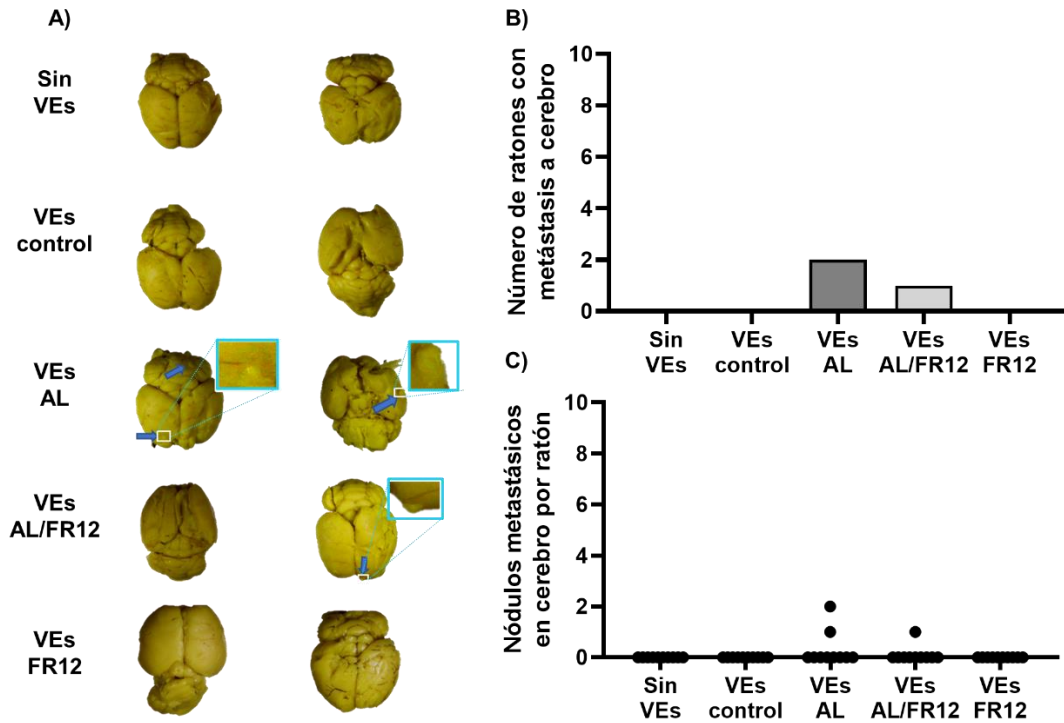


Figura 24. El pretratamiento de células 4T1 con VEs no induce mayor metástasis a cerebro. Cerebros recuperados de ratones Balb/cJ inoculados con células 4T1 pretratadas con VEs. **A)** Imagen representativa de cerebros de ratones de cada grupo experimental, las flechas azules marcan nódulos metastásicos. **B)** Análisis del número de ratones con metástasis a cerebro. **C)** Análisis del número de nódulos metastásicos en cerebro por ratón. El gráfico muestra la media y los valores individuales en cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía.

7. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres tanto a nivel nacional como a nivel mundial (GLOBOCAN, 2020b, c). Diversos factores se han asociado con su desarrollo, entre los cuales, el alto consumo de ácidos grasos se ha estudiado ampliamente (Bojková et al., 2020). En este aspecto, a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) esenciales omega-3 y omega-6, se les han atribuido efectos opuestos en el desarrollo del cáncer de mama (Zanoaga et al., 2018).

El consumo de PUFAs omega-3 se ha descrito como un factor protector; y se ha reportado que el tratamiento con ácido docosahexaenoico (DHA) en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, es capaz de inhibir la expresión de miR-21, provocando a un aumento en la expresión de PTEN, que modula la actividad de la vía PI3K/Akt, y en consiguiente disminuye la expresión del factor estimulador de colonias 1 (CSF-1), un factor prometastásico (Mandal et al., 2012). Adicionalmente, el DHA tiene un efecto apoptótico y regula a la baja genes relacionados con los procesos de migración e invasión en células MDA-MB-231.

Por otro lado, al alto consumo de PUFAs omega-6 se le han atribuido efectos adversos en el desarrollo del cáncer de mama. Se ha demostrado que el AL induce transición epitelio-mesénquima en células MCF10A y estimula los procesos de invasión, migración y formación de esferoides en células MDA-MB-231 (Espinosa-Neira et al., 2011; Diaz-Aragon et al., 2019). Es importante destacar que en estos estudios la concentración de AL utilizada fue de 90 μ M, la cual es inferior al rango de 0.2-5 mM reportado en plasma de jóvenes adultos sanos (Abdelmagid et al., 2015). Asimismo, un estudio previo correlacionó el alto consumo de AL con el desarrollo de cáncer gástrico, demostrando que una dieta alta en AL induce mayor invasión y formación de metástasis a través de la actividad de COX-1, ya que al inhibirla con Indometacina disminuyen los efectos promovidos por el AL (Matsuoka et al., 2010).

En este proyecto, se decidió evaluar el papel de COX-1 en los procesos de migración e invasión inducidos por AL en líneas celulares de cáncer de mama; y se

observó que el uso de FR122047, un inhibidor específico de COX-1 inhibe la invasión y migración inducida por el AL en las células MDA-MB-231 y 4T1, ambas con un fenotipo TNBC. En este aspecto, previamente se ha descrito una correlación entre el uso de ácido acetil salicílico (AAS) con un menor riesgo de desarrollo, recurrencia y mortalidad por cáncer de mama (Holmes et al., 2010; Takkouche et al., 2008). El AAS es un inhibidor inespecífico de COXs, y aunque diversos estudios han asociado su efecto con la inhibición de COX-2 (Mazhar et al., 2006), se ha descrito que la inhibición de COX-1 a nivel plaquetario, provoca una disminución en la secreción de factores proangiogénicos y un aumento en factores antiangiogénicos (Holmes et al., 2013). Además, en células MCF-7 el tratamiento con AAS provoca un cambio en la deformación y fuerza celular, que puede afectar los procesos de migración e invasión (Milani et al., 2022). Cabe destacar que los efectos mediados por COX-1 se atribuyen a la producción de eicosanoides, entre ellos PGE2, que una vez secretados, se unen a GPCRs y activan vías de señalización como PI3K/Akt que promueve la progresión del cáncer de mama (Wang et al., 2021).

Estudios previos también han reportado que el AL induce la secreción de VEs en células MDA-MB-231, y que estas a su vez favorecen los procesos de migración e invasión en esta misma línea celular, así como el proceso de transición epitelio mesénquima en células MCF10A y angiogénesis en células HUVEC (Galindo-Hernandez et al., 2014; Garcia-Hernandez et al., 2021; Ramirez-Ricardo et al., 2021). En este proyecto se evaluó la participación COX-1 en la secreción de VEs inducida por AL, para lo cual se realizó su aislamiento a partir de medios condicionados de células MDA-MB-231 sin tratamiento, tratadas con AL, tratadas con AL e inhibiendo COX-1, y sólo con inhibición de COX-1. La caracterización mostró en todos los casos VEs heterogéneas, desde exosomas de 50 nm hasta microvesículas entre 500 y 800 nm. Notablemente, se observó que el AL indujo una mayor secreción de VEs, y que la inhibición con COX-1 inhibió este efecto; por tanto, el aumento en la secreción de VEs estimulado por AL se lleva a cabo por una vía independiente COX-1. Anteriormente, se demostró que el AL actúa a partir de la activación de los receptores FFAR1 y FFAR4 en células MDA-MB-231, y que esto

conlleva a la transactivación del EFGR y PLD1/2 a través de Src (Serna-Marquez et al., 2017; Diaz-Aragon et al., 2019). Asimismo, estudios previos han mostrado que PLD1 controla la secreción de VEs, a partir de su activación por Ral GTPasas en células de cáncer de mama (Ghoroghi et al., 2021). Se ha demostrado que la modulación de otros componentes que participan en el proceso de biogénesis de exosomas, como Rab27a y Rab22a puede impactar su secreción en células de cáncer de mama (Ostrowski et al., 2010; Bobrie et al., 2012; Wang et al., 2014). También, se ha descrito que la GTPasa RhoA puede aumentar la secreción de VEs en células MDA-MB-231 tras su activación mediada por la cinasa Src (Tognoli et al., 2021). Por otra parte, se ha reportado que sintenina-1 participa en la biogénesis de exosomas, además de regular otros procesos como migración e invasión en el cáncer de mama (Lee et al., 2023). Así, el AL podría estar afectando la secreción de VEs a través de la modulación de alguno de estos componentes relacionados con su biogénesis.

La internalización de las VEs es un proceso clave para la transferencia de reguladores biológicos y sus efectos posteriores en las células receptoras (Choi et al., 2017). En este estudio se observó que las VEs derivadas de células MDA-MB-231 son capturadas por células 4T1; sin embargo, las VEs AL se capturaron en mayor proporción, efecto que no se observó al inhibir COX-1. En este aspecto, se han descrito diversos mecanismos donde participan moléculas ligando/receptor en entre VEs y células que dirigen el proceso de captura (Colombo et al., 2014). Entre estos, la unión de HSPG con Integrina-beta-3 (ITGB3) es necesaria para la internalización de VEs y su modulación en la formación de colonias en células MDA-MB-231 (Fuentes et al., 2020). Por ello, se propone que las VEs AL presentan proteínas en su superficie que favorecen una mayor captura por células 4T1, y que este cargo es dependiente de COX-1.

Como se ha mencionado previamente, las VEs modulan distintos procesos celulares relacionados con la cascada metastásica, entre ellos la migración (Wang y Gires, 2019). En este estudio se mostró que el tratamiento de células 4T1 con VEs AL promueven su capacidad migratoria y metastásica a pulmón e hígado; este efecto no se observó con las VEs en las cuales se inhibió COX-1; por tanto, se

propone que el tratamiento con AL provoca un cambio de carga en VEs secretadas por células MDA-MB-231, y que COX-1 participa en la inclusión de moléculas que promueven estos procesos. En este aspecto, se ha descrito ampliamente que el cargo de las VEs cambia respecto a la célula de origen, y que éste refleja las características fenotípicas de la célula secretora en el cáncer de mama (Dalla et al., 2020). Asimismo, las VEs de cáncer de mama transfieren miRNAs, lncRNAs y proteínas de señalización que modifican el fenotipo de las células receptoras y promueven los procesos de migración, invasión y metástasis (Wang et al., 2020; Xia et al., 2021; Zhou et al., 2021; González-King et al., 2022.). Adicionalmente, algunas proteínas regulan selectivamente el cargo prometastásico en VEs, modulando vías de señalización; como ejemplo, la Aspartato β -hidroxilasa (ASPH) regula la vía de Notch y esto conlleva a la secreción de VEs, que promueven la invasión y metástasis (Lin et al., 2019). Por otro lado, los cambios fisiológicos también provocan estos cambios, entre ellos, la hipoxia provoca la secreción de VEs que inducen la invasión en células MDA-MB-231 (Pachane et al., 2022). También, se ha descrito que ácidos grasos como el DHA, además de modificar la expresión de miRNAs en células de cáncer de mama, modifica el contenido de los miRNAs en los exosomas secretados por estas células (Mandal et al., 2012; Hannafon et al., 2015)

En resumen, los resultados de este proyecto sugieren que COX-1 media el cambio de carga en VEs inducido por AL, que promueven los procesos de migración y metástasis en células de cáncer de mama TNBC.

8. CONCLUSIÓN

La enzima COX-1 participa en los procesos de migración e invasión inducidos por el AL en células TNBC. Además, modula el cambio de carga en VEs inducida por el AL, que promueven los procesos de migración y metástasis a pulmón e hígado en células de cáncer de mama TNBC. Este estudio proporciona una nueva perspectiva sobre la participación de COX-1 en la progresión del cáncer de mama inducido por el AL, y revela un posible blanco para tratamiento del cáncer de mama.

9. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el contenido proteico y RNAs presentes en las VEs derivadas de MDA-MB-231 estimuladas con AL e inhibiendo COX-1.
2. Evaluar el mecanismo por el cual COX-1 modularía el cambio de cargo en las VEs derivadas de células MDA-MB-231 estimuladas con AL.
3. Evaluar los mecanismos moleculares por los cuales cargos específicos de las VEs AL inducen mayor capacidad migratoria y metastásica en células 4T1.
4. Evaluar la participación de las VEs derivadas de MDA-MB-231 estimuladas con AL e inhibiendo COX-1 en la modulación del microambiente tumoral *in vitro* e *in vivo*.

10. REFERENCIAS

- Abdelmagid, S.A., Clarke, S.E., Nielsen, D.E., Badawi, A., El-Soheemy, A., Mutch, D.M., and Ma, D.W. (2015). Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PLoS one* 10, e0116195.
- Abels, E.R., and Breakefield, X.O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36, 301-312.
- Anders, C.K., Johnson, R., Litton, J., Phillips, M., and Bleyer, A. (2009). Breast cancer before age 40 years. *Seminars in oncology* 36, 237-249.
- Ataollahi, M.R., Sharifi, J., Paknahad, M.R., and Paknahad, A. (2015). Breast cancer and associated factors: a review. *Journal of medicine and life* 8, 6-11.
- Bartlett, K., and Eaton, S. (2004). Mitochondrial β -oxidation. *271*, 462-469.
- Bebelman, M.P., Smit, M.J., Pegtel, D.M., and Baglio, S.R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & therapeutics* 188, 1-11.
- Bobrie, A., Krumeich, S., Reyat, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M., and Théry, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer research* 72, 4920-4930.
- Bojková, B., Winklewski, P.J., and Wszedybyl-Winkiewska, M. (2020). Dietary Fat and Cancer-Which Is Good, Which Is Bad, and the Body of Evidence. *International journal of molecular sciences* 21.
- Calder, P.C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* 39, 18s-32s.
- Cancer, C.G.o.H.F.i.B. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet. Oncology* 13, 1141-1151.
- Cejudo-Arteaga, S., Guerrero-Ramos, M., Kuri-Exome, R., Martínez-Cordero, E., Farias-Serratos, F., and Maldonado-Vega, M. (2022). Epidemiology of Breast

- Cancer in Mexican Women with Obesity as a Risk Factor. *International journal of molecular sciences* 23.
- Choi, D., Lee, T.H., Spinelli, C., Chennakrishnaiah, S., D'Asti, E., and Rak, J. (2017). Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation. *Seminars in cell & developmental biology* 67, 11-22.
- Colditz, G.A., Bohlke, K., and Berkey, C.S. (2014). Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast cancer research and treatment* 145, 567-579.
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. 30, 255-289.
- Dalla, P.V., Santos, J., Milthorpe, B.K., and Padula, M.P. (2020). Selectively-Packaged Proteins in Breast Cancer Extracellular Vesicles Involved in Metastasis. *International journal of molecular sciences* 21.
- de Carvalho, C., and Caramujo, M.J. (2018). The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23.
- Diaz-Aragon, R., Ramirez-Ricardo, J., Cortes-Reynosa, P., Simoni-Nieves, A., Gomez-Quiroz, L.E., and Perez Salazar, E. (2019). Role of phospholipase D in migration and invasion induced by linoleic acid in breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 457, 119-132.
- Ellsworth, D.L., Turner, C.E., and Ellsworth, R.E. (2019). A Review of the Hereditary Component of Triple Negative Breast Cancer: High- and Moderate-Penetrance Breast Cancer Genes, Low-Penetrance Loci, and the Role of Nontraditional Genetic Elements. *Journal of oncology* 2019, 4382606.
- Espinosa-Neira, R., Mejia-Rangel, J., Cortes-Reynosa, P., and Salazar, E.P. (2011). Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 1782-1791.
- Fahlén, M., Zhang, H., Löfgren, L., Masironi, B., von Schoultz, E., von Schoultz, B., and Sahlin, L. (2017). Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-

2, syndecan-1 and connective tissue growth factor in benign and malignant breast tissue from premenopausal women. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 33, 353-358.

Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H., Salhab, H.A., and Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, 28.

Fuentes, P., Sesé, M., Guijarro, P.J., Emperador, M., Sánchez-Redondo, S., Peinado, H., Hümmer, S., and Ramón, Y.C.S. (2020). ITGB3-mediated uptake of small extracellular vesicles facilitates intercellular communication in breast cancer cells. *Nature communications* 11, 4261.

Galindo-Hernandez, O., Serna-Marquez, N., Castillo-Sanchez, R., and 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, leukotrienes, and essential fatty acids* 91, 299-310.

Garcia-Hernandez, A., Leal-Orta, E., Ramirez-Ricardo, J., Cortes-Reynosa, P., Thompson-Bonilla, R., and Salazar, E.P. (2021). 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 mediators* 153, 106519.

Ghoroghi, S., Mary, B., Larnicol, A., Asokan, N., Klein, A., Osmani, N., Busnelli, I., Delalande, F., Paul, N., Halary, S., *et al.* (2021). Ral GTPases promote breast cancer metastasis by controlling biogenesis and organ targeting of exosomes. *eLife* 10.

GLOBOCAN (2020a). Breast.

GLOBOCAN (2020b). Mexico.

GLOBOCAN (2020c). World.

González-King, H., Tejedor, S., Ciria, M., Gil-Barrachina, M., Soriano-Navarro, M., Sánchez-Sánchez, R., Sepúlveda, P., and García, N.A. (2022). Non-classical Notch signaling by MDA-MB-231 breast cancer cell-derived small

- extracellular vesicles promotes malignancy in poorly invasive MCF-7 cells. *Cancer gene therapy* 29, 1056-1069.
- Hannafon, B.N., Carpenter, K.J., Berry, W.L., Janknecht, R., Dooley, W.C., and Ding, W.Q. (2015). Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Molecular cancer* 14, 133.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., and Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers* 5, 66.
- Holmes, C.E., Jasielec, J., Levis, J.E., Skelly, J., and Muss, H.B. (2013). Initiation of aspirin therapy modulates angiogenic protein levels in women with breast cancer receiving tamoxifen therapy. *Clinical and translational science* 6, 386-390.
- Holmes, M.D., Chen, W.Y., Li, L., Hertzmark, E., Spiegelman, D., and Hankinson, S.E. (2010). Aspirin intake and survival after breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 1467-1472.
- Hu, M., Yao, J., Carroll, D.K., Weremowicz, S., Chen, H., Carrasco, D., Richardson, A., Violette, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., *et al.* (2008). Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer cell* 13, 394-406.
- INEGI (2022). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). (Comunicado de prensa 591/22).
- Jandacek, R.J. (2017). Linoleic Acid: A Nutritional Quandary. *Healthcare (Basel, Switzerland)* 5.
- Jones, M.E., Schoemaker, M.J., Wright, L.B., Ashworth, A., and Swerdlow, A.J. (2017). Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast cancer research : BCR* 19, 118.
- Karmokar, P.F., and Moniri, N.H. (2022). Oncogenic signaling of the free-fatty acid receptors FFA1 and FFA4 in human breast carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* 206, 115328.

- Kimura, I., Ichimura, A., Ohue-Kitano, R., and Igarashi, M. (2020). Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *100*, 171-210.
- Leal-Orta, E., Ramirez-Ricardo, J., Cortes-Reynosa, P., Galindo-Hernandez, O., and 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. *Journal of cell communication and signaling* *13*, 235-244.
- Lee, K.M., Seo, E.C., Lee, J.H., Kim, H.J., and Hwangbo, C. (2023). The Multifunctional Protein Syntenin-1: Regulator of Exosome Biogenesis, Cellular Function, and Tumor Progression. *International journal of molecular sciences* *24*.
- Li, C.I., Malone, K.E., Daling, J.R., Potter, J.D., Bernstein, L., Marchbanks, P.A., Strom, B.L., Simon, M.S., Press, M.F., Ursin, G., *et al.* (2008). Timing of menarche and first full-term birth in relation to breast cancer risk. *American journal of epidemiology* *167*, 230-239.
- Lin, Q., Chen, X., Meng, F., Ogawa, K., Li, M., Song, R., Zhang, S., Zhang, Z., Kong, X., Xu, Q., *et al.* (2019). ASPH-notch Axis guided Exosomal delivery of Prometastatic Secretome renders breast Cancer multi-organ metastasis. *Molecular cancer* *18*, 156.
- Liput, K.P., Lepczyński, A., Ogłuszka, M., Nawrocka, A., Poławska, E., Grzesiak, A., Ślaska, B., Pareek, C.S., Czarnik, U., and Pierzchała, M. (2021). Effects of Dietary n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammation and Cancerogenesis. *International journal of molecular sciences* *22*.
- Mandal, C.C., Ghosh-Choudhury, T., Dey, N., Choudhury, G.G., and Ghosh-Choudhury, N. (2012). miR-21 is targeted by omega-3 polyunsaturated fatty acid to regulate breast tumor CSF-1 expression. *Carcinogenesis* *33*, 1897-1908.
- Matsuoka, T., Adair, J.E., Lih, F.B., Hsi, L.C., Rubino, M., Eling, T.E., Tomer, K.B., Yashiro, M., Hirakawa, K., Olden, K., *et al.* (2010). Elevated dietary linoleic acid increases gastric carcinoma cell invasion and metastasis in mice. *British journal of cancer* *103*, 1182-1191.

- Mazhar, D., Ang, R., and Waxman, J. (2006). COX inhibitors and breast cancer. *British journal of cancer* *94*, 346-350.
- Mentoor, I., Engelbrecht, A.M., and Nell, T. (2019). Fatty acids: Adiposity and breast cancer chemotherapy, a bad synergy? Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids *140*, 18-33.
- Milani, D., Khorramymehr, S., and Vasaghi-Gharamaleki, B. (2022). The Effect of Acetylsalicylic Acid (Asa) on the Mechanical Properties of Breast Cancer Epithelial Cells. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* *17*, 410-415.
- Möller, A., and Lobb, R.J. (2020). The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. *Nature Reviews Cancer* *20*, 697-709.
- Nakamura, M.T., Yudell, B.E., and Loor, J.J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in lipid research* *53*, 124-144.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., *et al.* (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology* *12*, 19-30; sup pp 11-13.
- Pachane, B.C., Nunes, A.C.C., Cataldi, T.R., Micocci, K.C., Moreira, B.C., Labate, C.A., Selistre-de-Araujo, H.S., and Altei, W.F. (2022). Small Extracellular Vesicles from Hypoxic Triple-Negative Breast Cancer Cells Induce Oxygen-Dependent Cell Invasion. *International journal of molecular sciences* *23*.
- Pandya, S., and Moore, R.G. (2011). Breast development and anatomy. *Clinical obstetrics and gynecology* *54*, 91-95.
- Place, A.E., Jin Huh, S., and Polyak, K. (2011). The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast cancer research : BCR* *13*, 227.
- Polyak, K., and Kalluri, R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a003244.
- Ramirez-Ricardo, J., Leal-Orta, E., Garcia-Hernandez, A., Diaz-Aragon, R., Cortes-Reynosa, P., Thompson-Bonilla, R., and 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. *Medical oncology* (Northwood, London, England) *38*, 40.
- Rodríguez-Cuevas, S., Macías, C.G., Franceschi, D., and Labastida, S. (2001). Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer* *91*, 863-868.
- Scully, O.J., Bay, B.-H., Yip, G., and Yu, Y. (2012). *Breast Cancer Metastasis*. *9*, 311-320.
- Selmin, O.I., Donovan, M.G., Stillwater, B.J., Neumayer, L., and Romagnolo, D.F. (2020). Epigenetic Regulation and Dietary Control of Triple Negative Breast Cancer. *Frontiers in nutrition* *7*, 159.
- Serna-Marquez, N., Diaz-Aragon, R., Reyes-Uribe, E., Cortes-Reynosa, P., and Salazar, E.P. (2017). Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Medical oncology* (Northwood, London, England) *34*, 111.
- Serna-Marquez, N., Villegas-Comonfort, S., Galindo-Hernandez, O., Navarro-Tito, N., Millan, A., and Salazar, E.P. (2013). Role of LOXs and COX-2 on FAK activation and cell migration induced by linoleic acid in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cellular oncology* (Dordrecht) *36*, 65-77.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry* *69*, 145-182.
- Society, A.C. (2022). *Lifestyle-related Breast Cancer Risk Factors*. (The American Cancer Society medical and editorial content team).
- Sun, Y.S., Zhao, Z., Yang, Z.N., Xu, F., Lu, H.J., Zhu, Z.Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.P., and Zhu, H.P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences* *13*, 1387-1397.
- Szczuko, M., Kikut, J., Komorniak, N., Bilicki, J., Celewicz, Z., and Ziętek, M. (2020). The Role of Arachidonic and Linoleic Acid Derivatives in Pathological Pregnancies and the Human Reproduction Process. *International journal of molecular sciences* *21*.

- Takkouche, B., Regueira-Méndez, C., and Etminan, M. (2008). Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 1439-1447.
- Tayyem, R.F., Mahmoud, R.I., Shareef, M.H., and Marei, L.S. (2019). Nutrient intake patterns and breast cancer risk among Jordanian women: a case-control study. *Epidemiology and health* 41, e2019010.
- Tognoli, M.L., Vlahov, N., Steenbeek, S., Grawenda, A.M., Eyres, M., Cano-Rodriguez, D., Scrace, S., Kartsonaki, C., von Kriegsheim, A., Willms, E., *et al.* (2021). RASSF1C oncogene elicits amoeboid invasion, cancer stemness, and extracellular vesicle release via a SRC/Rho axis. *The EMBO journal* 40, e107680.
- Torres-Alamilla, P., Castillo-Sanchez, R., Cortes-Reynosa, P., Gomez-Ortega, R., and Perez Salazar, E. (2023). Bisphenol A increases the size of primary mammary tumors and promotes metastasis in a murine model of breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 111998.
- Tsimidou, M., Blekas, G., and Boskou, D. (2003). OLIVE OIL. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, ed. (Oxford: Academic Press), pp. 4252-4260.
- Tvrzicka, E., Kremmyda, L.S., Stankova, B., and Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 155, 117-130.
- Vieira, R., Tobar, J.S.S., Dardes, R., Claudio, L., and Thuler, S. (2018). Alcohol Consumption as a Risk Factor for Breast Cancer Development: A Case-Control Study in Brazil. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 19, 703-707.
- Wang, B., Mao, J.H., Wang, B.Y., Wang, L.X., Wen, H.Y., Xu, L.J., Fu, J.X., and Yang, H. (2020). Exosomal miR-1910-3p promotes proliferation, metastasis, and autophagy of breast cancer cells by targeting MTMR3 and activating the NF- κ B signaling pathway. *Cancer letters* 489, 87-99.

- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., Hu, J., Fleming, I., and Wang, D.W. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 6, 94.
- Wang, H.X., and Gires, O. (2019). Tumor-derived extracellular vesicles in breast cancer: From bench to bedside. *Cancer letters* 460, 54-64.
- Wang, T., Gilkes, D.M., Takano, N., Xiang, L., Luo, W., Bishop, C.J., Chaturvedi, P., Green, J.J., and Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E3234-3242.
- Whelan, J., and Fritsche, K. (2013). Linoleic acid. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 4, 311-312.
- Xia, W., Liu, Y., Cheng, T., Xu, T., Dong, M., and Hu, X. (2021). Extracellular Vesicles Carry lncRNA SNHG16 to Promote Metastasis of Breast Cancer Cells via the miR-892b/PPAPDC1A Axis. *Frontiers in cell and developmental biology* 9, 628573.
- Zanoaga, O., Jurj, A., Raduly, L., Cojocneanu-Petric, R., Fuentes-Mattei, E., Wu, O., Braicu, C., Gherman, C.D., and Berindan-Neagoe, I. (2018). Implications of dietary ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids in breast cancer. *Exp Ther Med* 15, 1167-1176.
- Zhao, Y., Dong, X., Li, R., Song, J., and Zhang, D. (2015). Correlation Between Clinical-Pathologic Factors and Long-Term Follow-Up in Young Breast Cancer Patients. *Translational oncology* 8, 265-272.
- Zhou, D., Gu, J., Wang, Y., Wu, H., Cheng, W., Wang, Q., Zheng, G., and Wang, X. (2021). Long non-coding RNA NEAT1 transported by extracellular vesicles contributes to breast cancer development by sponging microRNA-141-3p and regulating KLF12. *Cell & bioscience* 11, 68.