



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“PARTICIPACIÓN DE LOS METABOLITOS DEL ÁCIDO
ARAQUIDÓNICO EN LA INDUCCIÓN DE MIGRACIÓN DE
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA, EN
RESPUESTA AL ESTÍMULO CON ÁCIDO LINOLEICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALEJANDRO MILLÁN VEGA

CODIRECTOR DE TESIS: Dr. JOSÉ EDUARDO PÉREZ SALAZAR

CHILPANCINGO, GRO., NOVIEMBRE DE 2010.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio 42 a cargo del Dr. José Eduardo Pérez Salazar, siendo becaria CONACYT de septiembre de 2008 a julio de 2010 con número de registro 272992.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas sus bendiciones y por darme la oportunidad de alcanzar con éxito una más de mis metas.

A mi director de tesis, Dr. Alejandro Millán Vega por el apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar por su guía, su asesoramiento y por integrarme en su equipo de trabajo, permitiendo la culminación del presente.

A mis sinodales: Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, Dr. Donaciano Flores Robles, Dr. Pavel Sierra Martínez, por sus valiosas aportaciones al presente trabajo.

Al M. en C. Napoleón Navarro Tito, por su invaluable colaboración, entera disposición y por toda la paciencia y el apoyo brindados.

A mis amigos de la Maestría en Ciencias Biomédicas, por brindarme su amistad y por todas las gratas experiencias compartidas.

DEDICATORIAS

A mi madre, la mujer más importante de mi vida, a quien simple y sencillamente le debo todo lo que soy.

A Bruno Serrano, que con su ejemplo me ha enseñado que la voluntad lo hace todo posible; por sus invaluable enseñanzas y consejos, determinantes en mi vida.

A mi padre †, cuyo inmenso amor seguirá motivándome siempre.

A David, compañero de mi vida desde hace seis años, por todo el amor y la comprensión que me ha brindado siempre.

A mi abuelita Chaliá†, pues sus enseñanzas me acompañarán toda la vida.

A mi hermana Alondra, por brindarme su apoyo y contagiarme de su alegría.

A todos mis amigos, los de siempre, a quienes les agradezco inmensamente el compartir las experiencias buenas y malas enriqueciendo mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	25
REFERENCIAS	30

RESUMEN

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que existe relación entre la elevada ingesta de grasas y el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Trabajos previos han demostrado que el ácido linoleico (AL), un ácido graso poliinsaturado que se obtiene a través de la dieta, aumenta la migración de células de cáncer de mama *in vitro*. Sin embargo, aún no se han caracterizado de manera precisa los mecanismos moleculares que regulan estos eventos.

El objetivo del presente estudio fue demostrar que el AL promueve procesos de migración y evaluar si induce la activación de moléculas clave implicadas en los mismos como la cinasa de adhesión focal (FAK) y la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), así como si esta respuesta es dependiente de la actividad de enzimas que metabolizan el ácido araquidónico (AA) (el AL es el principal precursor del AA), comprendiendo a las ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX) y/o citocromo P450 monooxigenasas (CYP450), y dependiente también de la actividad de proteínas G_i/G_0 , y $G_{q/11}$, que se encuentran acopladas a receptores de ácidos grasos.

Nuestros resultados mostraron que el AL promueve la migración en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, y que esta respuesta disminuyó de manera importante al utilizar un inhibidor de LOX, así como en menor medida con los inhibidores de COX y de CYP450. Así mismo, el uso de inhibidores de proteínas G_i/G_0 y $G_{q/11}$ abatió la migración inducida por el AL. Los ensayos de Western Blot mostraron que el estímulo con AL indujo un rápido aumento en la fosforilación de FAK y de ERK; lo cual sugiere que la migración inducida por este ácido graso está siendo regulada por ambas moléculas en esta línea celular.

Esto representa un avance en el entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en la inducción de migración de células de cáncer de mama en respuesta a ácidos grasos.

Palabras clave: cáncer de mama, ácido linoleico, migración celular, FAK, ERK, MDA-MB-231

ABSTRACT

Various epidemiological studies suggest a link between high fat intake and risk of breast cancer. Previous work has demonstrated that linoleic acid (LA), a dietary polyunsaturated fatty acid, increases the migration of breast cancer cells *in vitro*. However, the signal transduction pathways that regulate these events remain uncharacterized.

The aim of the present study was to demonstrate whether LA induces cell migration and assess whether induces activation of key cell-migration regulatory molecules such as focal adhesion kinase (FAK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in MDA-MB-231 breast cancer cells, whether this response is dependent on the activity of enzymes that metabolize arachidonic acid (AA) (LA is the main precursor of AA) such as cyclooxygenases (COX), lipoxygenases (LOX) and/or cytochrome P450 monooxygenases (CYP450)), and also dependent on the activity of G_i/G_0 , and $G_{q/11}$ proteins.

Our results showed that LA promotes migration in the breast cancer cell line MDA-MB-231; this response was decreased significantly using a LOX inhibitor, and to a lesser extent with the COX and CYP450 inhibitors. In addition, using G_i/G_0 , and $G_{q/11}$ inhibitors abolished linoleic acid-induced migration. Western Blot assays showed that stimulation with LA induced a rapid increase in FAK and ERK phosphorylation; this suggests that this fatty acid-induced migration in this cell line is regulated by both molecules.

This work provides an advance in the understanding of the molecular events involved in fatty acid-induced cell migration on breast cancer cells.

Keywords: breast cancer, linoleic acid, cell migration, FAK, ERK, MDA-MB-231

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tumor maligno más común en las mujeres (Binukumar y Mathew, 2005) y el segundo cuando se consideran juntos ambos sexos; comprendiendo aproximadamente el 18% del total de cánceres en la mujer (Rodríguez-Cuevas y Capurso-García, 2006; Parkin *et al.*, 2005). En México, el cáncer mamario es la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica en la población femenina mayor de 25 años (Knaul *et al.*, 2008); en el caso particular del estado de Guerrero, las muertes por cáncer de mama ocupan el segundo lugar después de las reportadas por cáncer cérvico-uterino (SSA, 2005), por lo que representa un importante problema de salud pública.

Existen ciertos factores de riesgo, tanto biológicos como ambientales, que predisponen a las mujeres al desarrollo de cáncer de mama. Un factor ambiental que ha cobrado gran importancia en los últimos años corresponde al consumo de grasas (Rodríguez-Cuevas y Capurso-García, 2006; Binukumar y Mathew, 2005; Parkin *et al.*, 2005; Parodi, 2005; Reyes *et al.*, 2004; McPherson *et al.*, 2000), puesto que diversos estudios de tipo experimental han mostrado que los ácidos grasos tienen un fuerte efecto potenciador en el desarrollo y progresión de los tumores (Benatti *et al.*, 2004; Fay *et al.*, 1997; Hilakivi-Clarke *et al.*, 1996), además de que existen reportes que indican que la obesidad, caracterizada por una hiperlipidemia con una elevación de ácidos grasos libres en circulación sanguínea, está asociada con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer mamario (Calle y Kaaks, 2004; Felber y Golay, 2002).

Los ácidos grasos son los componentes estructurales básicos de los triglicéridos, y se encuentran también en los fosfolípidos y los ésteres de colesterol. Entre éstos, destacan los ácidos grasos esenciales (EFA's), los cuales son necesarios para la vida y como no pueden ser producidos de forma endógena (Lenore, 2003), deben ser obtenidos de la dieta; es por eso que reciben el nombre de esenciales (Undurti, 2006). Existen dos tipos principales de EFA's, los de la serie ω -6 y los de la serie ω -3; entre éstos, el ácido graso ω -6 más importante es el ácido linoleico (AL), mismo que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de maíz, el aceite de girasol, el

aceite de soya y el aceite de cártamo (Benatti *et al.*, 2004; Adam, 1989). Los ácidos grasos desempeñan funciones de suma importancia en muchos tejidos, regulando diversos procesos biológicos (Prentki y Madiraju, 2008; Hardy *et al.*, 2005; Katsuma *et al.*, 2005; Jump, 2004; Briscoe *et al.*, 2003; Khan y Vanden-Heuvel, 2003) como el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación celular (Jump, 2004). Sin embargo, aún no se han caracterizado de manera precisa los mecanismos celulares que regulan estos efectos. En el caso específico del ácido linoleico, éste puede ser convertido a ácido araquidónico (AA) (Undurti, 2006), que posteriormente se esterifica en las membranas celulares (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Levick *et al.*, 2007; Jump, 2004). Las citocinas, los factores de crecimiento y otros estímulos inducen la liberación del AA por acción de la fosfolipasa A2 (PLA2), sirviendo como sustrato ya sea para la ciclooxigenasa-1 (COX-1, una enzima constitutiva), o para la COX-2 (una enzima inducible), dando origen a los prostanoídes y a los tromboxanos; también, las lipooxigenasas (5-LOX, 12-LOX o 15-LOX) catalizan la formación de leucotrienos y ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETESs) a partir de AA; finalmente, una tercera ruta para la producción de eicosanoides involucra a las citocromo P450 monooxigenasas (CYP450), generando una amplia variedad de eicosanoides, tales como los epóxidos, los hidroxi-ácidos de cadena mediana, los hidroxi-ácidos ω , y los dihidroxi-ácidos (Wymann y Schneider, 2008; Levick *et al.*, 2007). Todos estos metabolitos están implicados en una amplia variedad de procesos biológicos y se ha demostrado que las células tumorales producen cantidades mucho mayores de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y eicosanoides que sus contrapartes normales, donde los eicosanoides derivados del metabolismo del AL han sido relacionados a incrementos en el crecimiento celular y la metástasis (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Benatti *et al.*, 2004; Goetzl *et al.*, 1995).

Los ácidos grasos también ejercen sus funciones directamente a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). De manera reciente, se ha descrito a un grupo de receptores de ácidos grasos acoplados a proteínas G que se encargan de regular diversas funciones inducidas por estas moléculas (Tanaka *et al.*, 2008): FFAR1 (receptor de ácidos grasos libres 1, anteriormente conocido como GPR40), FFAR2 (anteriormente denominado GPR43), FFAR3 (anteriormente GPR41), y

GPR120. FFAR2 y FFAR3 son activados por ácidos grasos de cadena corta, mientras que FFAR1 y GPR120 son activados por ácidos grasos de cadena mediana y larga (Costanzi *et al.*, 2008; Hirasawa *et al.*, 2005; Katsuma *et al.*, 2005; Briscoe *et al.*, 2003). Los análisis farmacológicos de FFAR1 y su distribución en los tejidos sugieren que este receptor juega un papel muy importante en la función de las células β pancreáticas (Costanzi *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2007; Katsuma *et al.*, 2005) y en la función neurológica (Briscoe *et al.*, 2003). Por su parte, GPR120 se expresa en las células endocrinas del intestino promoviendo la secreción del péptido 1 similar a glucagon (GLP-1) (Costanzi *et al.*, 2008; Kim y Egan, 2008; Hirasawa *et al.*, 2005; Katsuma *et al.*, 2005). Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G_i/G_0 y G_q/G_{11} (Briscoe *et al.*, 2003), por lo que su interacción con sus respectivos ligandos resulta en la activación de diversas vías de señalización con efectos biológicos variados (Wettschureck y Offermanns, 2005). Sin embargo, también se ha reportado que tanto FFAR1 como GPR120 están expresados en líneas celulares de cáncer de mama (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Soto-Guzmán *et al.*, 2008) y su presencia en estas células está asociada con la activación de diversas vías de señalización que dan como resultado la inducción de proliferación (Hardy *et al.*, 2005), evasión de la apoptosis (Katsuma *et al.*, 2005), invasión, metástasis (Soto-Guzmán *et al.*, 2008) y migración (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Nony *et al.*, 2005; Paine *et al.*, 2000).

La migración celular dirigida es un proceso dependiente de una secuencia dinámica de adhesión célula-substrato en la orilla líder de la célula coordinada con la disociación célula-substrato en la parte trasera (Frame *et al.*, 2002), que requiere de la interacción regulada de numerosas moléculas implicadas en el mismo, entre las que se encuentran la cinasa de adhesión focal (FAK) y la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Huang *et al.*, 2004; González *et al.*, 1991). FAK es una tirosina cinasa que juega un importante papel en las vías de transducción de señales que son iniciadas en los sitios de las adhesiones celulares mediadas por integrinas (van Nimwegen y van de Water, 2007). ERK fosforila residuos de serina o treonina seguidos por prolina (Huang *et al.*, 2004; González *et al.*, 1991) y tiene como sustratos a varias proteínas cinasas que pueden regular las dinámicas de la

adhesión focal y de la reorganización de los microtúbulos y los filamentos de actina. Estos últimos desempeñan papeles importantes en la extensión y la retracción de los lamelopodios durante la migración celular (Huang *et al.*, 2004). Existe evidencia experimental de que los ácidos grasos araquidónico y oleico tienen la capacidad de inducir migración en líneas celulares de cáncer de mama mediante la activación de FAK y de ERK, respectivamente (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Soto-Guzmán *et al.*, 2008). A pesar de esto, se desconoce si el AL posee la capacidad de inducir migración en células de cáncer de mama y si este efecto es mediado de manera directa a través de la activación de receptores, o bien de manera indirecta a través de la acción de sus metabolitos. Por otro lado, no ha sido reportado si el AL puede activar a moléculas que son participantes clave en el proceso de migración, tales como FAK y ERK.

De esta manera, planteamos la hipótesis de que el ácido linoleico es capaz de inducir migración dependiente de la actividad de ciclooxigenasas, lipooxigenasas o citocromo P450 monooxigenasas, y de la actividad de proteínas G_i/G_0 , y $G_{q/11}$; así como de promover la activación de FAK y de ERK en células de cáncer de mama.

El objetivo de este estudio fue evaluar si el AL induce procesos de migración y activación de moléculas implicadas de manera importante en los mismos, y si esta respuesta migratoria es dependiente de la actividad de enzimas que metabolizan AA y de la actividad de proteínas que se encuentran acopladas a receptores de ácidos grasos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y reactivos

Las cajas de Petri y las cámaras de Boyden fueron de Corning Inc. (NY, USA). El AL, la toxina pertussis (PTX) y la toxina colérica (CTX) fueron comprados de Sigma-Aldrich (Missouri, USA). El ácido norhidroguaiarético (NDGA), el (E)-2,3',4,5'-tetrametoxistilbeno (TMS) y el 5-bromo-2-(4-fluorofenil)-3-(4-)metilsulfonil) fenil tiofeno (Dup-697) fueron de Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA). El anticuerpo anti-fosfotirosina 397 (anti-PY³⁹⁷) de FAK fue obtenido de Invitrogen. Los anticuerpos anti-FAK, anti-fosfotirosina 202/ anti-fosfoserina 204 (PY²⁰²/PS²⁰⁴) de ERK, anti-ERK, anti-IgG de ratón y de conejo conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) fueron de Santacruz Biotechnology (CA, USA). El kit de quimioluminiscencia fue adquirido de Amersham (Buckinghamshire, UK).

Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama de tipo epitelial, MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 fueron mantenidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 3.7 g/l de bicarbonato de sodio, 5% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos en una atmósfera que contiene 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C.

Protocolo de estimulación

Para la realización de los experimentos, los cultivos de células MDA-MB-231 en confluencia fueron mantenidos en ausencia de suero durante 24 horas y posteriormente fueron lavadas con PBS dos veces antes de la estimulación. Posteriormente, las células fueron tratadas con AL por diferentes tiempos (0, 3', 5', 10', 20' y 40') para el ensayo de curso temporal y a diferentes concentraciones (0, 15µM, 30µM, 60µM, 90µM y 120µM) para la curva dosis-respuesta. Para los ensayos de inhibición, previo al tratamiento con AL, las células fueron tratadas con PTX y CTX para inhibir receptores acoplados a proteínas G_i/G₀ y G_q/G₁₁, NDGA para lipooxigenasas, TMS para citocromo P450 monooxigenasas, Dup-697 para

ciclooxigenasas. La estimulación concluyó aspirando el medio y solubilizando a las células en 500 μ l de buffer RIPA (HEPES 50mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1mM, ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 100 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, glicerol 10%, Triton-X100 1%, desoxicolato de sodio 1%, $MgCl_2$ 1.5 mM, PMSF 1 mM) para la obtención de las proteínas totales. Los lisados se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue colectado en microtubos de plástico.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, utilizando un estuche de la marca Biorad.

Ensayo de migración mediante cierre de herida o scratch

Se realizaron en cajas de Petri de 60 mm de diámetro, las células se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron 100% de confluencia celular. Los cultivos celulares se mantuvieron en supresión de suero durante 24 horas en medio DMEM sin suero; posteriormente se trataron con 100 μ g/ml de mitomicina C durante 2 horas para evitar la proliferación celular, tras lo cual se aspiró el medio y se lavó dos veces con PBS 1x; se realizó una rayadura de manera manual y rápida en el centro de la caja utilizando una punta para pipeta automática de 10-100 μ l, al finalizar se lavó dos veces con PBS 1x para eliminar las células que se desprendieron al realizar el surco y se adicionó nuevamente DMEM sin suero en ausencia o presencia de inhibidores y/o AL. El progreso de la migración celular en la herida fue fotografiado a las 48 horas después del tratamiento usando un microscopio invertido acoplado a una cámara.

Western Blot

Cantidades iguales de las proteínas obtenidas fueron separadas por SDS-PAGE usando geles al 8% y al 10% para detectar la activación de FAK y de ERK1/2, respectivamente. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda (Biorad); se realizó la tinción de la membrana con rojo de Ponceau para verificar la eficiencia en la transferencia de proteínas. Para

evitar interacciones inespecíficas, se cubrieron los sitios irrelevantes incubando las membranas durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo con 3% de leche baja en grasa en PBS (Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl) y 0.1% de Tween 20. Después de un breve lavado con PBS, las membranas fueron incubadas durante 12 horas a 4°C con anticuerpo primario anti-PY³⁹⁷ FAK, anti-FAK, anti-PY²⁰²/PS²⁰⁴ ERK, anti-ERK, según el caso; posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS/Tween al 0.1%. Para la detección de las proteínas de interés se utilizó un anticuerpo secundario policlonal de ratón o de conejo acoplado a peroxidasa de rábano en PBS/Tween 20 0.1% durante dos horas en agitación constante. En seguida, las membranas fueron lavadas tres veces con PBS/Tween 20 al 0.1%. Las bandas relevantes fueron detectadas por autorradiografía (X-OMAT Kodak) empleando un estuche de quimioluminiscencia. La intensidad relativa de las bandas fue determinada por medio de análisis densitométrico empleando el programa SigmaGel.

Ensayos de migración en cámaras de Boyden

Los ensayos de migración fueron efectuados en cámaras de Boyden con filtro con un poro de 0.8 µm de diámetro. Las células MDA-MB-231 fueron sometidas a supresión de suero durante 24 horas antes de la estimulación y tratadas con mitomicina C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se despegaron con tripsina 0.25% y verseno 0.02%, y se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer para posteriormente colocar 100,000 células en la parte superior de la cámara de Boyden en medio DMEM sin suero. En la parte inferior de la cámara se colocaron 500 µl con las diferentes condiciones de estimulación. Estas células fueron incubadas durante 48 horas a 37°C, tras lo cual se aspiró el medio de los dos compartimientos; las células se fijaron con metanol frío durante 5 minutos, después las células que no migraron fueron removidas de la parte superior de la cámara con un hisopo de algodón, y las células contenidas en la parte inferior fueron teñidas con cristal violeta 0.1% durante 10 minutos. Las membranas se lavaron 4 veces con agua bidestilada, luego fueron desteñidas con ácido acético al 10%, y la solución

resultante se analizó empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

Análisis de datos

Los resultados fueron expresados como medias \pm D.E. (desviación estándar) de por lo menos tres repeticiones de los experimentos. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía y la comparación entre grupos se realizó usando la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Se consideró un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

El ácido linoleico promueve migración celular en células MDA-MB-231.

La evidencia científica disponible indica que algunos ácidos grasos de cadena larga tienen la capacidad de promover procesos de migración en líneas celulares de cáncer de mama (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Nony *et al.*, 2005; Paine *et al.*, 2000). Con base en lo anterior, se decidió demostrar si el AL induce procesos de migración en la línea celular MDA-MB-231, las cuales se cultivaron hasta alcanzar un 100% de confluencia y fueron tratadas como se describió en material y métodos. Como se muestra en la figura 1, las células MDA-MB-231 tratadas con AL mostraron un incremento en la migración hacia el centro de la herida, observándose una respuesta migratoria mayor en las células tratadas con 90 μM de AL en comparación con las células control (sin tratamiento).

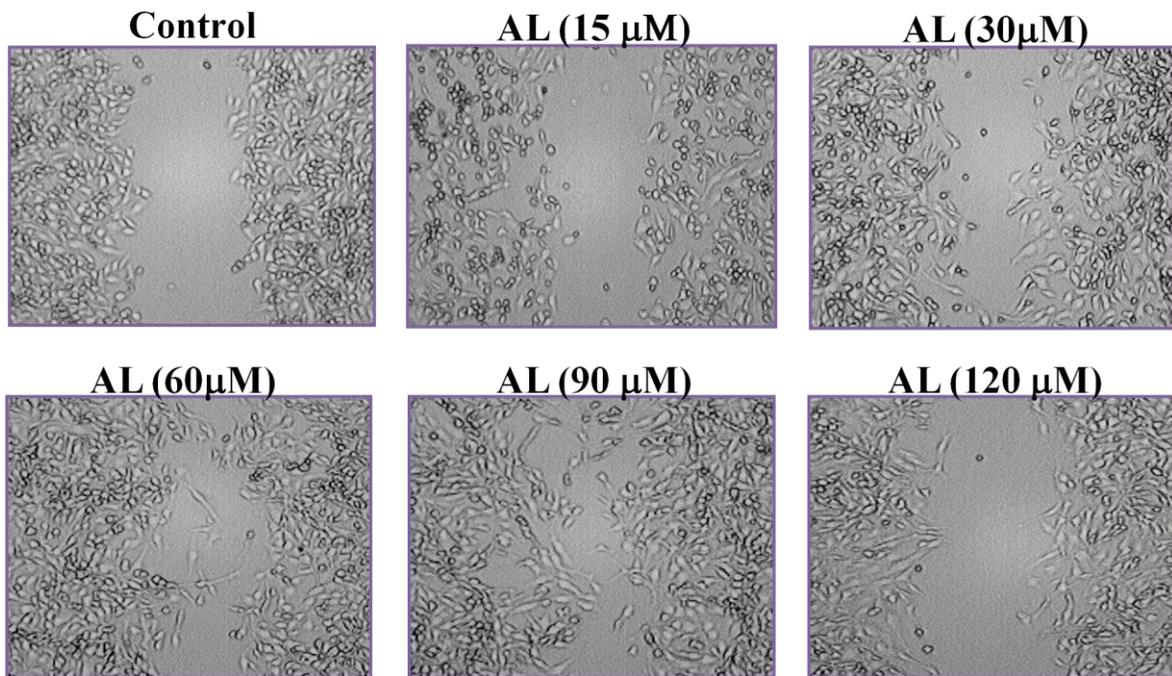


Figura 1. *El ácido linoleico promueve migración en células MDA-MB-231.* Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C durante 2 horas. Se realizó una herida en el centro de las cajas con la punta de una pipeta automática. Las células fueron incubadas en DMEM con diferentes concentraciones de AL según se indica. Las fotografías fueron tomadas 48 horas después de haber realizado la rayadura. Los resultados mostrados son representativos de al menos 3 repeticiones de los experimentos.

Papel de COX, LOX y CYP450 en la migración celular inducida por ácido linoleico.

Existen estudios en los que se ha demostrado que los metabolitos derivados de la actividad de las enzimas COX, LOX y CYP450 participan activamente en la inducción de migración y adhesión de células de cáncer de mama (Navarro-Tito *et al.*, 2008; Nony *et al.*, 2005; Kennett *et al.*, 2004; Paine *et al.*, 2000; Palmantier *et al.*, 1996; Johanning y Lin, 1995). El AL puede ser convertido a AA y por lo tanto es susceptible de ser metabolizado por COX, LOX y/o CYP450. Con el fin de analizar la contribución de los metabolitos de AA en la migración inducida en células de cáncer mamario en respuesta al estímulo con AL, se evaluó el efecto de varios inhibidores específicos del metabolismo de AA: NDGA, TMS y Dup-697, inhibidores selectivos de LOX, CYP450 y COX, respectivamente, en ensayos de cierre de herida. Las células MDA-MB-231 fueron tratadas en ausencia o presencia de 10 μM de NDGA, 3.1 μM de TMS o 5 μM de Dup-697 durante 24 horas. Posteriormente, se realizó una rayadura al centro de las cajas y se estimuló con o sin 90 μM de AL por 48 horas. Los resultados muestran que el tratamiento con cualquiera de los tres inhibidores afectó la migración celular inducida por el AL (Figura 2). Como se aprecia en la figura 2, el tratamiento con NDGA originó una marcada inhibición de la migración, mientras que el tratamiento con Dup-697 y con TMS provocó una ligera disminución en dicha migración; lo anterior, en comparación con las células estimuladas con AL en ausencia de inhibidores. Para reforzar nuestros resultados, se efectuaron además ensayos de migración en cámaras de Boyden (Figura 3). Nuevamente y de acuerdo con los resultados previos obtenidos en los ensayos de cierre de herida, los inhibidores de COX (Dup-697) y de CYP450 (TMS), tuvieron un efecto moderado sobre el número de células que migraron, a diferencia del inhibidor de LOX (NDGA), que disminuyó de manera importante el número de células que migraron hacia la parte inferior de la cámara observado en las células estimuladas con AL.

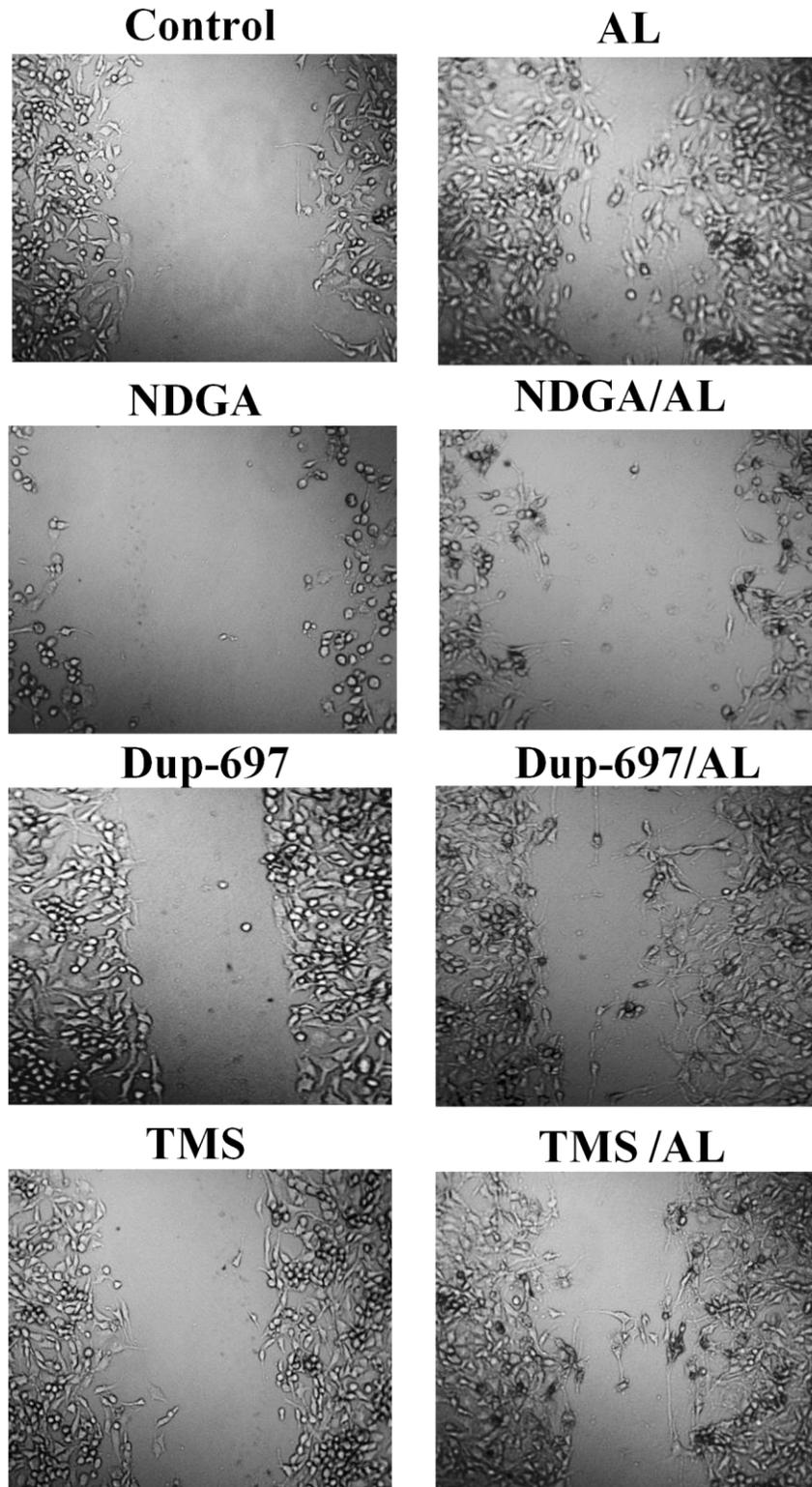


Figura 2. Papel de COX, LOX y CYP450 en la migración celular inducida por ácido linoleico. Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas hasta alcanzar 100% de confluencia y tratadas durante 24 horas con o sin 10 μ M de NDGA, 3.1 μ M de TMS o 5 μ M de DuP-697. Posteriormente, las células fueron incubadas 2 horas con 100 μ g/ml de mitomicina C. Transcurrido este tiempo, se realizó una

herida en el centro de las cajas con la punta de una pipeta automática de 10-100 μ l. Las células fueron incubadas durante 48 horas adicionales en DMEM conteniendo 90 μ M de AL con o sin 10 μ M de NDGA, 3.1 μ M de TMS o 5 μ M de DuP-697. Las fotografías fueron tomadas 48 horas después de haber realizado la rayadura. Los resultados mostrados son representativos de al menos 3 repeticiones de los experimentos.

De manera conjunta, estos resultados muestran que la migración inducida por AL en células de cáncer mamario depende principalmente de los metabolitos de AA generados por LOX, y en menor grado de los metabolitos de AA derivados de la actividad de COX y de CYP450.

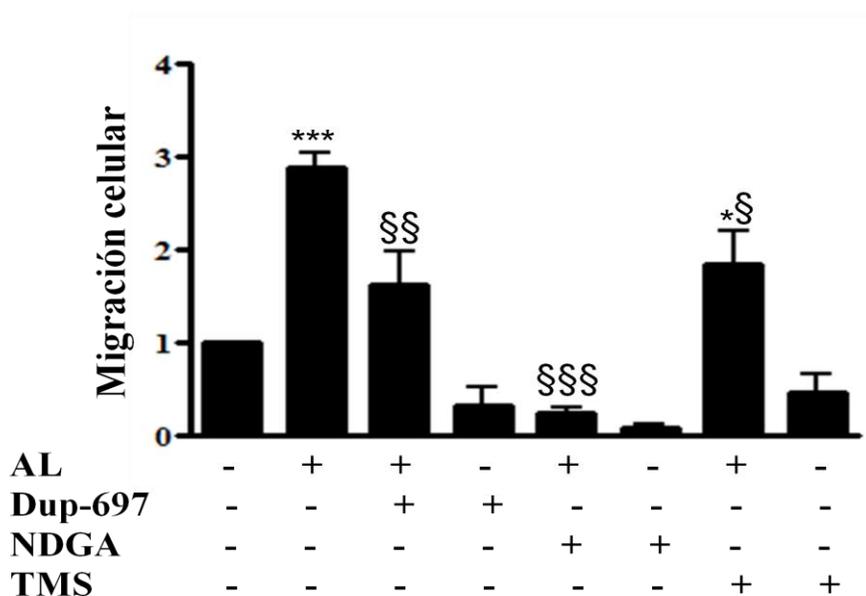


Figura 3. Papel de COX, LOX y CYP450 en la migración celular inducida por ácido linoleico. Las células MDA-MB-231 fueron sometidas a supresión de suero durante 24 horas antes de la estimulación y tratadas con mitomicina C durante 2 horas. Después, se colocaron 100,000 células en la parte superior de la cámara de Boyden en medio DMEM sin suero. En la parte inferior de la cámara se colocaron 500 μ l con o sin 10 μ M de NDGA, 3.1 μ M de TMS o 5 μ M de DuP-697 en presencia o ausencia de 90 μ M de AL. Estas células fueron incubadas durante 48 horas a 37°C, tras lo cual las células se fijaron con metanol frío. Las células que no migraron fueron removidas de la parte superior de la cámara con un hisopo de algodón, y las células contenidas en la parte inferior fueron teñidas con cristal violeta 0.1% durante 10 minutos. Las membranas se lavaron 4 veces, luego fueron desteñidas con ácido acético al 10%, y la solución resultante se analizó empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Las gráficas representan la media \pm D.E. de al menos tres experimentos independientes. * P< 0.05, *** P< 0.001 en comparación con el control; § P<0.05, §§ P<0.01, §§§ P<0.001 comparado con el estímulo; análisis por ANOVA de una vía.

La migración celular inducida por ácido linoleico es dependiente de la actividad de receptores acoplados a proteínas G_i/G_0 y G_q/G_{11} .

Se ha descrito que los receptores de ácidos grasos de cadena mediana y larga FFAR1 y GPR120 se encuentran acoplados a proteínas G de las familias G_i/G_0 y G_q/G_{11} (Wettschureck y Offermanns, 2005; Briscoe *et al.*, 2003). Con estos antecedentes, se decidió caracterizar el efecto de dos inhibidores de estas proteínas, PTX y CTX para proteínas G_i/G_0 y para proteínas G_q/G_{11} , en el patrón de migración observado tras el estímulo con AL. Se realizaron ensayos de cierre de herida o “scratch”, en los que las células fueron tratadas en presencia o ausencia de

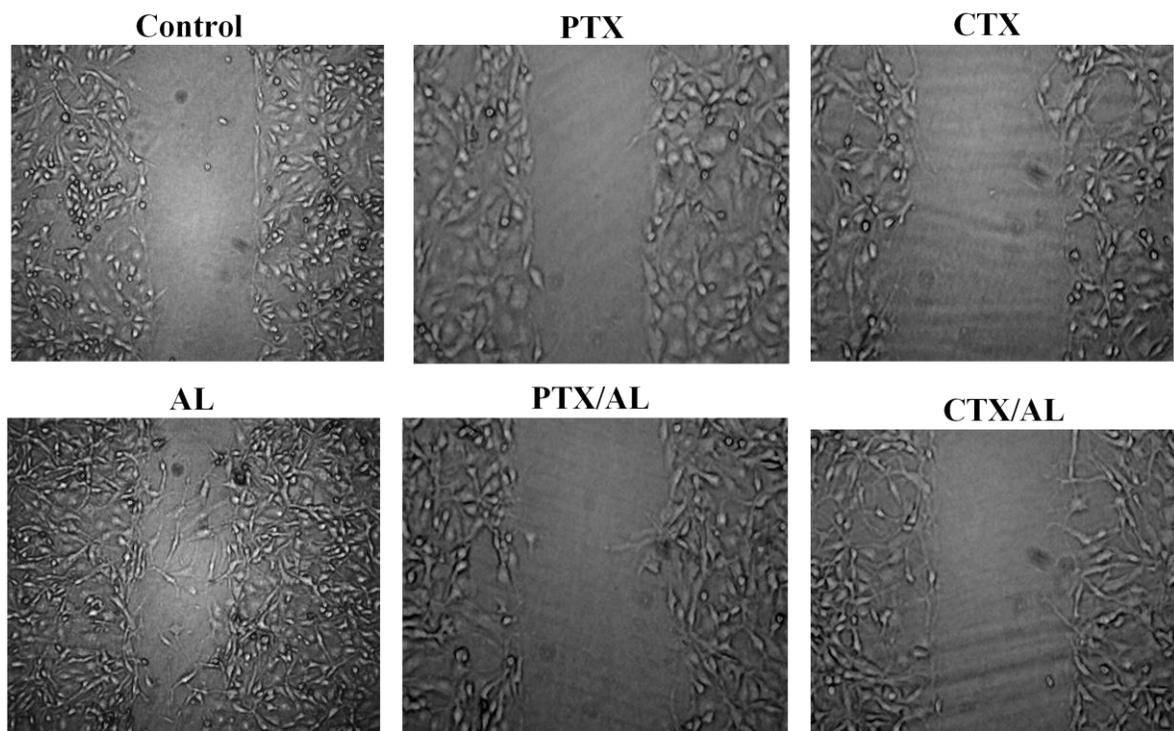


Figura 4. La migración celular inducida por ácido linoleico es dependiente de la actividad de receptores acoplados a proteínas G_i/G_0 y G_q/G_{11} . Los cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados con o sin 100 ng/ml de PTX y de CTX durante 12 y 24 horas, respectivamente, y tratados por 2 horas mas con 100 μ g/ml de mitomicina C. Se realizó una herida en el centro de las cajas con la punta de una pipeta automática de 10-100 μ l, y las células fueron incubadas durante 48 horas con 90 μ M de AL en presencia o ausencia de 100 ng/ml de PTX y de CTX . Las fotografías fueron tomadas 48 horas después de haber realizado la rayadura. Las imágenes son representativas de al menos 3 repeticiones de los experimentos.

100 ng/ml de PTX o de CTX durante 12 y 24 horas, respectivamente. Se realizó una rayadura en la parte central de las cajas de cultivo y se estimuló con 90 μ M de AL durante 48 horas. La figura 4 muestra cómo el tratamiento con ambas toxinas inhibió

la migración en respuesta al estímulo con AL, en comparación con las células que fueron estimuladas en ausencia de las toxinas. Para validar estos resultados, se realizaron ensayos de migración en cámaras de Boyden con o sin toxinas para evaluar el efecto de éstas sobre la migración. Al igual que en los ensayos de cierre de herida, tanto PTX como CTX inhibieron la migración celular hasta niveles similares a los de las células control (sin estímulo) (Figura 5). Estos resultados muestran que la migración estimulada por AL en células MDA-MB-231 es dependiente de la activación de receptores acoplados a proteínas G pertenecientes a las familias G_i/G_0 y G_q/G_{11} .

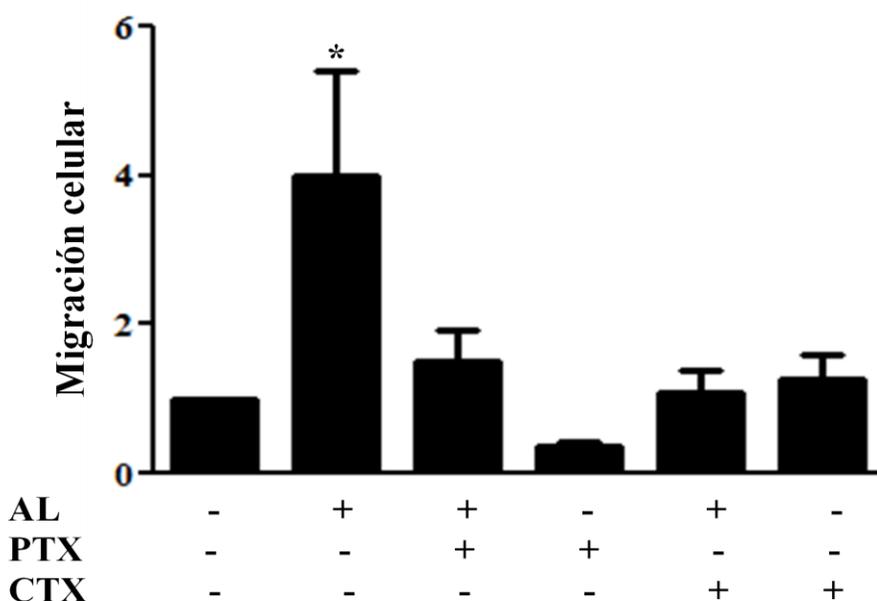


Figura 5. La migración celular inducida por ácido linoleico es dependiente de la actividad de receptores acoplados a proteínas G_i/G_0 y G_q/G_{11} . Los ensayos de migración celular fueron realizados como se describió previamente con o sin 100 ng/ml de PTX y de CTX en presencia o ausencia de 90 μ M de AL. Las gráficas representan la media \pm D.E. de al menos tres repeticiones de los experimentos. * $P < 0.05$ comparado con el control por análisis de ANOVA de una vía.

El ácido linoleico induce la activación de FAK y de ERK 1/2 en células de cáncer de mama.

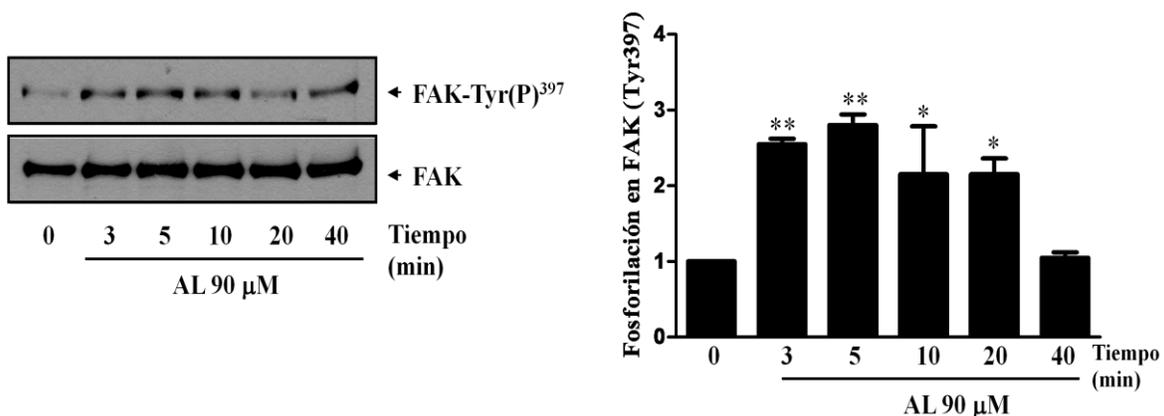
Puesto que el ácido linoleico es capaz de promover procesos de migración en células de cáncer de mama y debido a que estos procesos requieren de la activación de moléculas clave como FAK (van Nimwegen y van de Water, 2007) y ERK (Huang

et al., 2004; González *et al.*, 1991), investigamos si este ácido graso induce la activación de estas proteínas.

Para determinar si el AL activa a FAK, cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados con o sin AL a la concentración establecida previamente en los ensayos de migración de cierre de herida (90 μ M) a diferentes tiempos para después ser lisadas. Los lisados celulares fueron analizados por Western Blot usando un anticuerpo específico dirigido contra el sitio de autofosforilación de FAK (anti-FAK-Tyr(P)397). El tratamiento de las células con AL indujo un incremento en la fosforilación de la tirosina 397 de FAK (Figura 6A), que alcanzó un nivel máximo a los 5 minutos. Las mismas membranas fueron sometidas a Western Blot con un anticuerpo anti-FAK para confirmar que se recuperaron cantidades similares de FAK después del tratamiento en presencia o ausencia de AL.

De la misma manera, para evaluar si ERK1/2 puede ser activado en respuesta al estímulo con AL, las células MDA-MB-231 confluentes fueron tratadas con o sin AL (90 μ M) a diferentes tiempos, fueron lisadas y analizadas por Western Blot con un anticuerpo fosfoespecífico dirigido contra los sitios de fosforilación en treonina y tirosina de ERK1/2 (anti-ERK1/2-Thr202/Tyr204). Como lo muestra la figura 6B, el tratamiento de las células con AL generó un aumento en la activación de ERK1/2, de acuerdo con la fosforilación observada en la Thr-202 y en la Tyr-204. Dicha activación alcanzó un nivel máximo a los 5 minutos tras el estímulo. El análisis por Western Blot con anticuerpo anti-ERK1/2 confirmó la recuperación de cantidades similares de ERK1/2 en presencia o ausencia de AL.

A



B

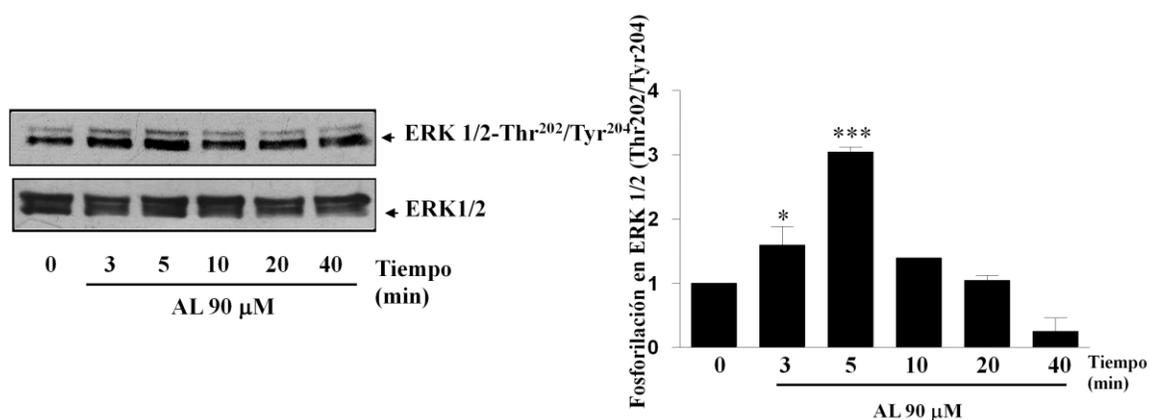


Figura 6. El ácido linoleico induce la activación de FAK y de ERK1/2 en células de cáncer de mama. **A)** Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con diferentes concentraciones de ácido linoleico y lisadas. La fosforilación de FAK en la Tyr-397 se analizó mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-FAK-Tyr(397). Las membranas fueron analizadas de manera adicional por Western Blot con un anticuerpo anti-FAK. **B)** Los cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron estimulados con diferentes concentraciones de AL, como se indica en la figura, y posteriormente fueron lisados. La fosforilación de ERK1/2 en Thr-202/Tyr-204 fue evaluada por Western Blot incubando las membranas con un anticuerpo anti-ERK1/2-Thr(202)/Tyr(204). Las membranas fueron analizadas también por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-ERK. Las autorradiografías son representativas de por lo menos 3 repeticiones de los experimentos. Las gráficas representan la media \pm D.E. de las repeticiones y están expresadas como el número de veces de estimulación en comparación con los controles (sin estimular). Los asteriscos denotan las comparaciones hechas con los controles. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, por ANOVA de una vía.

DISCUSIÓN.

Mediante diversos estudios tanto de tipo experimental como observacional se ha demostrado que existe una clara asociación entre las dietas caracterizadas por una alta ingesta de grasas y el riesgo de desarrollar cáncer mamario (Lahmann *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2003; Goodstine *et al.*, 2003; Hilakivi-Clarke *et al.*, 1996). Sin embargo, la evidencia científica disponible al respecto es escasa y actualmente es poco lo que se sabe acerca de las vías de transducción de señales reguladas por estos compuestos.

El AL es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga implicado en diversas vías de señalización celular que culminan con efectos relacionados directamente con la promoción de los procesos cancerosos. En experimentos realizados en líneas celulares, se demostró que el AL aumenta la migración de células de cáncer de mama (Byon *et al.*, 2009). Con base en esto, decidimos demostrar si el estímulo con AL tenía algún efecto sobre la migración de las células MDA-MB-231. De acuerdo con los antecedentes, observamos que el estímulo con AL produjo un aumento en la migración celular, en forma dependiente de dosis. De esta manera, nuestros resultados demuestran que el AL tiene la capacidad de promover la migración en células de cáncer de mama.

Por otro lado, el AL es también el precursor principal de otro ácido graso, el AA (Urquhart *et al.*, 2002), el cual a su vez, es metabolizado por las enzimas COX, LOX y CYP450, convirtiéndose así en el precursor de numerosos compuestos biológicamente activos (Hyde y Missailidis, 2009; Wang *et al.*, 2007). Existe evidencia de que los metabolitos derivados de la actividad de estas enzimas tienen diversos efectos sobre las células de cáncer de mama, como inducción de proliferación, invasión y migración. En un estudio previo, Dronadula *et al.* (2006) demostró que el AA promueve la movilidad de células vasculares de músculo liso mediante un mecanismo que involucra su metabolismo a través de las vías de COX y de LOX. En base a esto decidimos evaluar si la promoción de la migración inducida por el AL involucra la actividad de las enzimas que metabolizan AA. De acuerdo con el antecedente, nuestros resultados demostraron que la migración de células de cáncer de mama está mediada principalmente por la actividad de LOX, y en menor parte,

por la actividad de COX y de CYP450, debido a que la inhibición de LOX con NDGA redujo de manera importante la migración celular, mientras que la inhibición de COX y de CYP450 con Dup-697 y con TMS, respectivamente, causó una ligera disminución en la migración en respuesta al estímulo con AL. Este resultado concuerda también con un reporte previo de nuestro equipo en el que se muestra que la migración de células MDA-MB-231 es dependiente de la actividad de LOX (Navarro-Tito *et al.*, 2008), y con un trabajo independiente en el que la respuesta migratoria de esta línea celular depende tanto de LOX como de COX (You *et al.*, 2009). Sin embargo, en estos estudios el efecto evaluado fue una respuesta al estímulo con AA, por lo que el presente trabajo es el primero en demostrar el efecto de las moléculas resultantes del metabolismo del AA en respuesta al estímulo con AL. De la misma forma, complementa los resultados de otro grupo que muestran que la sobreexpresión de LOX promueve la acumulación de 12(S)-HETE e incrementa los niveles del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual es liberado al medio extracelular y estimula la migración de las células endoteliales (McCabe *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2006); así como los de Jiang *et al.* (2007), los que muestran que la sobreexpresión de CYP450 y la adición exógena de ácido epoxieicosatetraenoico (EET), un producto de la CYP450, promueve la migración, la invasión y aumenta la metástasis de las células MDA-MB-231. De esta manera, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los demostrados anteriormente, ya que muestran que la migración celular inducida en respuesta al AL depende de los metabolitos generados por LOX mayoritariamente y de los metabolitos generados por COX y CYP450 en menor medida, e integra el conocimiento sobre las vías de transducción de señales activadas como resultado del metabolismo de AA en respuesta al AL.

Los metabolitos derivados del AA son capaces de activar GPCRs. Entre éstos últimos destacan FFAR1 y GPR120, que son receptores de ácidos grasos de cadena mediana a larga (Gotoh *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2007; Hardy *et al.*, 2005; Hirasawa *et al.*, 2005; Katsuma *et al.*, 2004; Briscoe *et al.*, 2003) como el AL, y cuya existencia en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 ya ha sido comprobada (Navarro-Tito *et al.*, 2008). Se tiene conocimiento de que estos receptores se encuentran asociados a proteínas G de las familias G_i/G_0 y G_q/G_{11}

(Wettschureck y Offermanns, 2005; Briscoe *et al.*, 2003). Existen estudios previos en los que se ha demostrado que los metabolitos derivados del AA son capaces de activar GPCRs y promover la formación de placas de adhesión focal, lo que conduce a un aumento en la adhesión de las células de melanoma murino B16 a la fibronectina a través de un GPCR sensible a la acción de la PTX (Liu *et al.*, 1995); o bien de estimular la fosforilación de ERK 1/2 vía un GPCR sensible a la PTX (McCabe *et al.*, 2006). Puesto que la PTX es un inhibidor de proteínas G_i/G_0 y la CTX inhibe proteínas G_q/G_{11} (Moss y Vaughan, 1988) y considerando que los receptores a través de los cuales se sugiere que ejerce su efecto el AL están acoplados a estas proteínas, proponemos que la migración de las células de cáncer de mama estimulada por este ácido graso es mediada por GPCRs acoplados a estas familias de proteínas G. En efecto, los resultados obtenidos muestran una fuerte inhibición de la migración celular cuando las células son pretratadas con alguna de las dos toxinas, demostrando que este evento es dependiente de GPCRs acoplados a proteínas G_i/G_0 y G_q/G_{11} . De la misma manera, los resultados mostrados por otros grupos de investigación sustentan que el AA promueve migración en células ML-MCF-7 (una subclona metastásica de la línea celular MCF-7, derivada de una metástasis a pulmón proveniente de un ratón con inmunodeficiencia combinada severa) (You *et al.*, 2009) y en células MDA-MB-231 (You *et al.*, 2009; Navarro-Tito *et al.*, 2008) de manera dependiente de proteínas G_i/G_0 . Además, de manera coincidente con nuestros hallazgos, también se han obtenido resultados en los que se demuestra que la migración de las células MDA-MB-231 está regulada por proteínas G_q/G_{11} (Heakal y Kester, 2009), al igual que la migración de células NG108-15 (células de hibridoma generadas a partir de líneas celulares de neuroblastoma de rata y de glioma de ratón) (Ando *et al.*, 2010). Es así como el presente trabajo, demuestra que la migración de células MDA-MB-231 inducida por AL es mediada por la actividad de GPCRs acoplados a proteínas de las familias G_i/G_0 y G_q/G_{11} , aunque aún se necesita investigación adicional para esclarecer totalmente la identidad y participación de estos receptores en la vía de señalización inducida por AL.

El AL incrementa la adhesión de células MDA-MB-231 al matrigel y a la fibronectina por una vía dependiente de la actividad de LOX (Johanning y Lin, 1995), mientras que AA promueve la adhesión de las células de cáncer de mama MDA-MB-435 a la colágena tipo IV a través de una vía que involucra a 15(S)-lipooxigenasa-2 (Nony *et al.*, 2005; Palmantier *et al.*, 1996). Puesto que el ensamblaje y el desensamblaje de las adhesiones focales están regulados de manera importante por FAK, y en base a que algunos ácidos grasos incrementan la capacidad de adhesión de las células de cáncer de mama, consideramos la posibilidad de que el AL pudiera estar participando en la activación de FAK. En estudios anteriores se ha demostrado que en cáncer de mama el gen de FAK está amplificado y la proteína está sobreexpresada (Cance *et al.*, 2000; Agochiya *et al.*, 1999). FAK es activada por diversos estímulos, y está implicada en varias respuestas celulares, como diferenciación, proliferación, apoptosis, así como en las propiedades invasivas de las células cancerosas (Schaller, 2001; Owens *et al.*, 1995; Richardson y Parsons, 1995). Entre las funciones en las que interviene FAK, una de las más importantes es la migración, puesto que FAK es un importante regulador de este evento celular debido a que controla la regulación dinámica de los contactos focales (van Nimwegen y van de Water, 2007; McLean *et al.*, 2005). Un evento crítico en la señalización mediada por FAK es la fosforilación de su Tyr-397, lo que incrementa su actividad catalítica (Siesser y Hanks, 2006; Parsons, 2003). De acuerdo con nuestros resultados, en los que se demostró que el AL induce la activación de FAK de manera dependiente del tiempo, alcanzando un nivel máximo de fosforilación a los 5 minutos tras el estímulo, existen antecedentes que revelan que también el AA es capaz de inducir fosforilación de FAK en la Tyr-397 (Navarro-Tito *et al.*, 2008). Con esto se demuestra que los ácidos grasos, en este caso el AL específicamente, tiene la capacidad de inducir el estado de activación de FAK, lo que sugiere que la migración de las células de cáncer de mama se regula a través de esta molécula.

ERK es una cinasa que también participa de manera activa en la regulación del ensamblaje y desensamblaje de los contactos focales, fosforilando el residuo Ser-910 de FAK, lo que potencia la liberación de FAK de los contactos focales (Mitra *et al.*, 2005); posterior a la activación de FAK, ERK es reclutado, junto con otras

proteínas, al sitio donde se forma el contacto focal. En consecuencia, ERK fosforila a calpaína-2, la cual a su vez, realiza un corte proteolítico de proteínas como FAK y talina, participando así en el desensamblaje de la adhesión focal (McLean *et al.*, 2005). Por otra parte, ERK fosforila proteínas como paxilina, lo que promueve de nuevo el reclutamiento de FAK y por tanto, la formación de nuevos contactos focales (Mitra *et al.*, 2005). En otras investigaciones, se ha demostrado la capacidad de otros ácidos grasos como el ácido oleico (Soto-Guzmán *et al.*, 2008), y el AA (You *et al.*, 2009) de activar a ERK por fosforilación en sus residuos Thr-202 y Tyr-204. De acuerdo con ellos, y con nuestro antecedente de que el AL promueve migración de células de cáncer mamario, nuestro estudio muestra que el AL induce la activación de ERK, y tomando en cuenta el hecho de que está demostrada la participación de esta cinasa en la migración celular, podemos sugerir que este fenómeno podría estar siendo mediado por la intervención de ERK. Por el contrario, estos hallazgos contrastan con un estudio en el que se observó que el AL inhibió la fosforilación de ERK y la migración celular en células vasculares de músculo liso de rata (Cho y Lee, 2009). Sin embargo, hacen falta más estudios para sustentar estas hipótesis y que permitan establecer de manera clara el papel tanto de FAK como de ERK en la migración de células de cáncer de mama inducida por AL.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la estimulación de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 con AL promueve migración, de forma dependiente de la actividad de LOX, COX, CYP450, proteínas G_i/G_0 y G_q/G_{11} . Así mismo, el AL induce activación de FAK y de ERK en esta línea celular. En conjunto, estos datos constituyen un avance en el entendimiento de las vías de transducción de señales involucradas en los efectos de los ácidos grasos sobre las células de cáncer de mama y genera investigación futura con el fin de continuar esclareciendo estos procesos.

REFERENCIAS.

Adam O. (1989). Linoleic and linolenic acids intake. Dietary omega-3 and omega-6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality. *Series A: Life Sciences*; **171**: 391–402.

Agochiya M., Brunton V. G., Owens D. W., Parkinson E. K., Paraskeva C., Keith W. N., et al. (1999). Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells, *Oncogene*; **18**: 5646–5653.

Ando K., Obara Y., Sugama J., Kotani A., Koike N., Satoko O., et al. (2010). P2Y2 receptor-Gq/11 signaling at lipid rafts is required for UTP-induced cell migration in NG 108-15 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 10.1124/jpet.110.167528.

Benatti P., Peluso G., Nicolai R., Calvani M. (2004). Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J. Am. Coll. Nutr.*; **23**: 281 - 302.

Binukumar B., Mathew A. (2005). Dietary fat and risk of breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, **3**:45.

Boyd N. F., Stone J., Vogt K. N., Connelly B. S., Martin L. J., Minkin S. (2003). Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *Br. J. Cancer*; **89**: 1672–1685.

Brash A. R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **274**: 23679–23682.

Breitwieser G. E. (2004). G protein–coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ. Res.*; **94**:17-27.

Briscoe P., Tadayyon M., Andrews J. L., Benson W. G., Chambers J. K., Eilert M. M., et al. (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*; **278**: 11303-11311.

Byon C. H., Hardy R. W., Ren C., Ponnazhagan S., Welch D. R., McDonald J. M., et al. (2009). Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4. *Lab Invest*; **89**(11): 1221-1228.

Calle, E. E. and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, **4**: 579-591.

Cance W. G., Harris J. E., Iacocca M. V., Roche E., Yang X., Chang J., et al. (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin. Cancer Res.*; **6**: 2417–2423.

Cho M. K., Lee J. W. (2009). Linoleic acid inhibits PDGF-induced migration in aortic smooth muscle cells: the role of tissue inhibitor of metalloproteinase. *FASEB J*; **23**: LB387.

Constanzi S., Neumann S., Gershengorn M. C. (2008). Seven transmembrane-spanning receptors for free fatty acids as therapeutic targets for diabetes mellitus: pharmacological, phylogenetic, and drug discovery aspects. *J. Biol. Chem.*; **283**: 16269 - 16273.

Das U. N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J*; **1**(4): 420-39.

- Dronadula N., Rizvi F., Blaskova E., Li Q., Rao G. N.** (2006). Involvement of cAMP-response element binding protein-1 in arachidonic acid-induced vascular smooth muscle cell motility. *J. Lipid Res.*; **47**: 767-777.
- Evans J. F.** (2002). Cysteinyl leukotriene receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68–69**: 587–597.
- Fay M. P., Freedman L. S., Clifford C. K., Midthune D. N.** (1997). Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res*; **57**: 3979–3988.
- Felber, J. P. and Golay, A.** (2002). Pathways from obesity to diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*; **26 Suppl 2**: S39-45.
- Frame M. C., Fincham V. J., Carragher N. O., Wyke J. A.** (2002). v-SRC'S hold over actin and cell adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; **3**: 233-245.
- Fredriksson R., Höglund P. J., Gloriam D., Lagerström M. C., Schiöt H. B.** (2003). Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Letters*; **554**: 381-388.
- Goetzl E. J., An S., Smith W. L.** (1995). Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J*; **9**: 1051–1058.
- Gonzalez F. A., Raden D. L., Davis, R. J.** (1991). Identification of substrate recognition determinants for human Erk1 and Erk2 protein kinases. *J. Biol. Chem*; **266**: 22159-22163.
- Goodstine S., Zheng T., Holford T., Ward B., Carter D., Owens P., et al.** (2003). Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women. *J. Nutr.*; **133**: 1409 - 1414.
- Gotoh C., Hong Y., Iga T., Hishikawa D., Suzuki Y., Song S., et al.** (2007). The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **354(2)**: 591-7.
- Gutkind J. S.** (2000). Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci. STKE*, 2000: re1.
- Hardy S., St-Onge G., Joly E., Langelier Y., Prentki M.** (2005). Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J. Biol. Chem.*; **280**: 13285 - 13291.
- Heakal Y., Kester M.** (2009). Nanoliposomal short-chain ceramide inhibits agonist-dependent translocation of neurotensin receptor 1 to structured membrane microdomains in breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.*; **7**: 724 - 734.
- Hilakivi-Clarke L., Onojafe I., Raygada M., Cho E., Clarke R., Lippman M. E.** (1996). Breast cancer risk in rats fed a diet high in n-6 polyunsaturated fatty acids during pregnancy. *J Natl Cancer Inst*; **88**: 1821–1827.
- Hirasawa A., Tsumaya K., Awaji T., Katsuma S., Adachi T., Yamada M., et al.** (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*; **11(1)**: 90-4.

- Huang C., Jacobson K., Schaller M. D.** (2004). MAP kinases and cell migration. *J. Cell Sci.*; **117**: 4619 - 4628.
- Hyde C. A., Missailidis S.** (2009). Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int Immunopharmacol*; **9**(6): 701-715.
- Jiang J. G., Ning Y. G., Chen C., Ma D., Liu Z. J., Yang S., et al.** (2007). Cytochrome p450 epoxygenase promotes human cancer metastasis. *Cancer Res.*; **67**: 6665–6674.
- Johanning G.L., Lin T.Y.** (1995). Unsaturated fatty acid effects on human breast cancer cell adhesion, *Nutr. Cancer*; **24**: 57–66.
- Jump D. B.** (2004). Fatty acid regulation of gene transcription. *Jump Critical Reviews in Clinical Laboratory Scienc*; **41**(1):41–78.
- Katsuma S., Hatae N., Yano T., Ruike Y., Kimura M., Hirasawa A., et al.** (2005). Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J. Biol. Chem.*; **280**: 19507 - 19515.
- Kennett S.B., Roberts J.D., Olden K.** (2004). Requirement of protein kinase C micro activation and calpain-mediated proteolysis for arachidonic acid-stimulated adhesion of MDA-MB-435 human mammary carcinoma cells to collagen type IV. *J. Biol. Chem.*; **279**: 3300–3307.
- Khan S. A., Vanden-Heuvel J. P.** (2003). Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. *Journal of Nutritional Biochemistry*; **14**:554–567.
- Kim W., Egan J. M.** (2008). The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacol. Rev.*; **60**: 470 - 512.
- Knaul F. M., Nigenda G., Lozano R., Arreola-Ornelas H., Langer A., Frenk J.** (2008). Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod Health Matters*; **16**(32): 113-23.
- Lahmann P. H., Hoffmann K., Allen N., van Gils C. H., Khaw K. T., Tehard B., et al.** (2004). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer*; **111**: 762–771.
- Lenore A.** (2003). Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J. Nutr.*; **133**: 925S - 932S.
- Levick S. P., Loch D. C., Taylor S. M., Janicki J. S.** (2007). Arachidonic acid metabolism as a potential mediator of cardiac fibrosis associated with inflammation. *J. Immunol.*; **178**: 641 - 646.
- Liu B., Khan W. A., Hannun Y. A., Timar J., Taylor J. D., Lundy S., et al.** (1995). 12(S)-hydroxyicosatetraenoic acid and 13(S)-hydroxyoctadecadienoic acid regulation of protein kinase C-alpha in melanoma cells: role of receptor-mediated hydrolysis of inositol phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **92**: 9323–9327.
- McCabe N. P., Selman S. H., Jankun J.** (2006). Vascular endothelial growth factor production in human prostate cancer cells is stimulated by overexpression of platelet 12-lipoxygenase. *Prostate*; **66**: 779–787.

- McLean G. W., Carragher N. O., Avizienyte E., Evans J., Brunton V. G., Frame M. C.** (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer-A new therapeutic opportunity. *Nature Rev. Cancer*; **5**: 505-515.
- McPherson K., Steel C. M., Dixon J. M.** (2000). ABC of breast diseases: breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, **321**: 624 - 628.
- Mitra S. K., Hanson D. A., Schlaepfer D. D.** (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Rev Mol. Cell Biol.*; **6**: 56-68.
- Moss J., Vaughan M.** (1988). ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*; **61**: 303–379.
- Narumiya S., FitzGerald G. A.** (2001). Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J. Clin. Invest.* **108**: 25–30.
- Navarro-Tito N., Robledo T., Salazar E. P.** (2008). Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Exp Cell Res*; **314**(18): 3340-55.
- Nie D., Krishnamoorthy S., Jin R., Tang K., Chen Y., Qiao Y., et al.** (2006). Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.*; **281**: 18601–18609.
- Nony P. A., Kennett S. B., Glasgow W. C., Olden K., Roberts J. D.** (2005). 15(S)-lipoxygenase-2 mediates arachidonic acid-stimulated adhesion of human breast carcinoma cells through the activation of TAK1, MKK6, and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.*; **280**: 31413 - 31419.
- Owens L. V., Xu L., Craven R. J., Dent G. A., Weiner T. M., Kornberg L., et al.** (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.*; **55**: 2752–2755.
- Paine E., Palmantier R., Akiyama S. K., Olden K., Roberts J. D.** (2000). Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*; **275**(15): 11284-11290.
- Palmantier R., Roberts J.D., Glasgow W.C., Eling T., Olden K.** (1996). Regulation of the adhesion of a human breast carcinoma cell line to type IV collagen and vitronectin: roles for lipoxygenase and protein kinase C. *Cancer Res.* **56**: 2206–2212.
- Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.** (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**:74-108.
- Parodi P. W.** (2005). Dairy product consumption and the risk of breast cancer. *J. Am. Coll. Nutr.*; **24**: 556S - 568S.
- Parsons J. T.** (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.*; **116**: 1409-1416.
- Prentki M., Murthy-Madiraju S. R.** (2008). Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr. Rev.*; **29**: 647 - 676.

Reyes N., Reyes I., Tiwari R., Geliebter J. (2004). Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett*, **209**(1): 25-35.

Richardson A., Parsons J. T. (1995). Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase? *BioEssays*; **17**: 229–236.

Rodríguez-Cuevas S. A., Capurso-García M. (2006). Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecol Obstet Mex*, **74**:585-93.

Schaller M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta*; **1540**: 1–21.

Siesser P., Hanks S. K. (2006). The signaling and biological Implications of FAK overexpression in cancer. *Clin Cancer Res*; **12**(11): 3233-3237.

Soto-Guzman A., Robledo T., Lopez-Perez M., Salazar E. P. (2008). Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*; **294**(1-2): 81-91.

Tanaka T., Katsuma S., Adachi T., Koshimizu T., Hirasawa A., Tsujimoto G. (2008). Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; **377**(4-6): 523-7.

Urquhart P., Parkin S. M., Rogers J. S., Bosley J. A., Nicolaou A. (2002). The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*; **1580**: 150-160.

van Nimwegen M. J., van de Water B. (2007). Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*; **73**(5): 597-609.

Wang M. T., Honn K. V., Nie D. (2007). Cyclooxygenases, prostanoids and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*; **26**(3-4): 525-534.

Wettschureck N., Offermanns S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*; **85**: 1159–1204.

Wymann M. P., Schneider R. (2008). Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **9**(2): 162-76.

You J., Mi D., Zhou X., Qiao L., Zhang H., Zhang X., et al. (2009). A positive feedback between activated extracellularly regulated kinase and cyclooxygenase/lipoxygenase maintains proliferation and migration of breast cancer cells. *Endocrinology*; **150**: 1607 - 1617.

<http://www.salud.gob.mx>