

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Medicina Mexicali



“Estudio de la cafeína como posible regulador de los procesos de migración e invasión en la línea tumoral mamaria MDA-MB-231”

T E S I S

QUE PARA OBTENER GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA

LAFD. MARIO ISRAEL OREGEL CORTEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. OCTAVIO GALINDO HERNANDEZ

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina Campus Mexicali bajo la tutoría del Dr. Octavio Galindo Hernández, con el apoyo del proyecto “Estudio de la cafeína como regulador de los procesos de migración e invasión en células cancerosas mamarias invasivas” derivado de la 2^{da} Convocatoria Interna de la UABC, así como Apoyo para Nuevos PTC del PRODEP 2017.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Octavio Galindo Hernández**, por brindarme la confianza de formar parte de su grupo de investigación, por su paciencia, asesoría, y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A la **Dra. Gladys Eloisa Ramírez Rosales**, al **Dr. Victor Guadalupe Garcia González**, al **Dr. Nicolás Addiel Serafin Higuera** y al **Dr. Raúl Díaz Molina**, por su apoyo, amabilidad y asesoría durante la revisión de esta tesis.

Al **Dr. Jose Gustavo Vázquez Jimenez**, por su apoyo y amistad sincera durante el curso de mi formación académica.

A mis compañeros de maestría (Manuel, Rosa, Gaby, Diana, Paulina, Sergio, Julia) por compartir el estrés, retos, aprendizaje y tiempo de calidad durante el curso.

A mis compañeros de laboratorio, **Israel Martínez Navarro**, **Paloma Acosta**, **Javier Vasconcelos**, **Isle Anahí Méndez**, **Esmeralda Ibarra López**, **Leslie G. Lazcano**, **Anahí Calderón**, **Melissa González**. Les agradezco los momentos de convivencia, diversión y aprendizaje que pasamos juntos.

A **Marisela Rodríguez García**, por brindarme su comprensión, apoyo y amor durante esta etapa de mi vida.

DEDICATORIA

A **DIOS**, por nunca desampararme en tiempos difíciles, llevándome siempre de su mano mostrándome que no existen los límites.

A mi madre, **Lilia Edith Cortez** y a **Salvador Mancilla**, por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, por sus consejos, guía y amor. Por enseñarme que las cosas buenas de la vida se ganan con esfuerzo y dedicación. Agradezco infinitamente a DIOS por darme la oportunidad de ser educado e instruido por ella.

A mi abuela **Teresita Cortez**, a la cual prometí ser una persona de bien, y que algún día llenaría su corazón de orgullo donde quiera que estuviese.

A mi tío **Carlos Hernández Cortez**, que siempre fue un ejemplo de esfuerzo, perseverancia y amor hacia la familia.

INDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT.....	2
III.	ABREVIATURAS.....	3
IV.	INTRODUCCIÓN.....	4
	IV.1. Generalidades del cáncer mamario.....	4
	IV.2. Etiología del cáncer de mama.....	5
	IV.2.1. Factores de riesgo reproductivos y hormonales.....	6
	IV.2.2. Factores de riesgo genéticos.....	6
	IV.2.3. Factores de riesgo relacionados con el estilo de vida.....	7
	IV.3. Epidemiología del cáncer mamario.....	7
V.	PROGRESIÓN TUMORAL MAMARIA: PAPEL DE FAK, Src y MMPs.....	9
	V.1. FAK, Src y su relación con la migración e invasión tumoral mamaria.....	9
	V.2. Participación de MMP-2 y MMP-9 en la invasión tumoral mamaria.....	11
VI.	PROPIEDADES DEL CAFÉ Y SU RELACIÓN CON LA SALUD HUMANA.....	12
VII.	CAFEÍNA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER.....	13
VIII.	METABOLISMO DE LÍPIDOS Y EL CÁNCER.....	14
IX.	JUSTIFICACIÓN.....	16
X.	HIPÓTESIS.....	17
XI.	OBJETIVOS.....	18
	XI.1. Objetivo general.....	18
	XI.2. Objetivos particulares.....	18

XII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
	XII.1. Material biológico.....	19
	XII.2. Anticuerpos.....	19
	XII.3. Cultivo celular.....	20
	XII.4. Ensayos de cierre de herida.....	20
	XII.5. Zimografía.....	20
	XII.6. Inmunodetección.....	21
	XII.7. Ensayo de invasión en cámara de Boyden.....	22
	XII.8. Análisis estadístico.....	22
XIII.	RESULTADOS.....	23
	XIII.1. Cafeína promueve la disminución en la capacidad migratoria de células de la línea MDA-MB-231.....	23
	XIII.2. La cafeína a bajas concentraciones disminuye la capacidad migratoria en la línea MDA-MB-231.....	25
	XIII.3. Cafeína disminuye los niveles de fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) en la línea MDA-MB-231.....	27
	XIII.4. Cafeína disminuye los niveles de fosforilación de Src en la línea MDA-MB-231.....	29
	XIII.5. La cafeína a bajas concentraciones no promueve la regulación de los niveles de secreción de MMP-2 y -9 en la línea celular MDA-MB-231...	31
	XIII.6. La cafeína a bajas concentraciones disminuye la invasión en células MDA-MB-231.....	33
XIV.	CAFEÍNA Y SU RELACIÓN CON PROCESOS METABÓLICOS DE LA LÍNEA TUMORAL MAMARIA INVASIVA MDA-MB-231.....	35
	XIV.1. La cafeína disminuye aparentemente la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad.....	35
	XIV.2. La cafeína regula la expresión de SREBP-2 en células MDA-MB-231.....	37

XIV.3. La cafeína promueve un incremento en la expresión de ABCG1 en células.....	39
XIV.4. La cafeína aumenta la expresión de CD36 en la línea celular MDA-MB-231.....	41
XV. DISCUSIÓN.....	43
XIV.1. La cafeína disminuye la capacidad de migrar e invadir de las células tumorales altamente invasivas MDA-MB-231.....	43
XV.2. El papel de la cafeína en el metabolismo celular de la línea tumoral mamaria MDA-MB-231.....	46
XVI. CONCLUSIONES.....	49
XVII. BIBLIOGRAFÍA.....	50

I. RESUMEN

Evidencia acumulada ha reportado efectos anti-tumorales mediados por cafeína. Sin embargo, aún no se ha estudiado si la cafeína presenta efectos anti-cancerígenos en células tumorales mamarias a baja concentración, específicamente en concentraciones fisiológicas ($<412\mu\text{M}$). En este estudio, se decidió utilizar como modelo a la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, la cual cuenta con características de tumores triple negativo. Los cultivos celulares fueron incubados con diferentes concentraciones de cafeína (0, 250, 500 y 1000 μM) y se evaluó su impacto en procesos como migración e invasión tumoral. Los procesos de migración e invasión fueron analizados mediante el ensayo de cierre de herida y cámaras de Boyden recubiertas con Matrigel; los cambios moleculares a nivel de expresión y fosforilación proteica fueron analizados mediante Western blot, mientras que la secreción de MMPs fue evaluada mediante zimografía. Nuestros resultados demuestran que la cafeína induce una disminución en la activación y fosforilación de las cinasas FAK y Src, proteínas que están involucradas en la inducción de metástasis en células tumorales mamarias. Adicionalmente, altas concentraciones de cafeína promueven una disminución en la secreción de MMP-9 en el medio condicionado. Asimismo, los resultados muestran que la cafeína inhibe significativamente la migración e invasión tumoral a concentraciones fisiológicas. Por otro lado, múltiple evidencia asocia a la cafeína con el metabolismo celular. Sin embargo, aún se desconoce el efecto de la cafeína sobre el metabolismo de lípidos en células tumorales mamarias. Por esta razón que evaluamos el efecto de la cafeína sobre el metabolismo celular mediado por el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) utilizando la técnica de Western blot para el análisis de las variaciones en la expresión proteica. En resumen, nuestros hallazgos demuestran que la cafeína inhibe los procesos de migración e invasión celular en la línea tumoral mamaria MDA-MB-231. Además, resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo proponen que cafeína modula el metabolismo celular mediado por LDLR. Estos resultados permiten proponer a la cafeína como un candidato potencial para regular la progresión tumoral a concentraciones fisiológicas.

II. ABSTRACT

Accumulated evidence has reported anti-tumor effects mediated by caffeine. However, it has not yet been studied whether caffeine has anti-cancer effects in breast tumor cells at low concentration, specifically at physiologically applicable concentrations (<412 μ M). In this study, we decided to use the MDA-MB-231 breast cancer cell line as a model. Cell cultures were incubated with different concentrations of caffeine (0, 250, 500 and 1000 μ M) and the impact of caffeine on migration and tumor invasion was evaluated. The migration and invasion processes were analyzed by the wound closure test and Boyden chambers coated with Matrigel; Molecular changes at the level of expression and protein phosphorylation were analyzed by Western blot, while MMPs secretion was evaluated by zymography. Our results demonstrate that caffeine induces a decrease in the activation and phosphorylation of FAK and Src kinases, proteins that are involved in the induction of metastasis in mammary tumor cells. Additionally, high concentrations of caffeine promote a decrease in MMP-9 secretion in the conditioned medium. Also, the results show that caffeine significantly inhibits tumor migration and invasion at physiological concentrations. On the other hand, multiple evidence associates caffeine with cellular metabolism. However, the effect of caffeine on lipid metabolism in mammary tumor cells is still unknown. For this reason, we evaluate the effect of caffeine on the cellular metabolism mediated by the low-density lipoprotein receptor (LDLR) using the Western blot technique for the analysis of variations in protein expression. In summary, our findings demonstrate that caffeine inhibits the processes of cell migration and invasion in the mammary tumor line MDA-MB-231. In addition, results obtained by our work group propose that caffeine modulates LDLR-mediated cellular metabolism. These results allow us to propose caffeine as a potential candidate to regulate tumor progression at physiological concentrations.

III. ABREVIATURAS

ABCG1: Casette de unión a ATP subfamilia G miembro 1

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Arp2/3: Proteína relacionada con actina

BRCA1 y 2: Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1 y tipo 2

CD36: Grupo de diferenciación-36

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

FAK: Cinasa de adhesión focal

HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa

HRP: Peroxidasa de rábano picante

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDLR: Receptor de LDL

MAPK: Proteína cinasas activadas por mitógeno

MMP-2 y -9: Metaloproteinasas-2 y -9

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

pb: pares de base

PBS: Solución buffer de fosfatos

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

SH2: Dominio de homología a Src 2

SRE-1: Elemento regulador de esteroides-1

SREBP-2: Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides tipo 2

IV. INTRODUCCIÓN

IV.1. Generalidades del cáncer mamario.

La mama es una glándula secretora de leche durante el periodo de lactancia, la cual está conformada por diversas estructuras, entre las que se encuentran los lóbulos, ductos lumbinales ramificados y el pezón. Tanto lóbulos como ductos se encuentran constituidos por una bicapa de células epiteliales, la primera de ellas es conformada por células epiteliales lumbinales, las cuales, brindan estructura al lumen de los lóbulos y ductos; adyacente a las células epiteliales lumbinales se encuentra una capa de células mioepiteliales, las cuales a su vez están en contacto directo con la membrana basal. Además, el conjunto de dichas estructuras se encuentra sumergido en estroma, el cual conforma más del 80% de volumen de la mama (1, 2).

La glándula mamaria es propensa a desarrollar diversas patologías, entre ellas el cáncer de mama. Este es uno de los desafíos de la salud más relevantes de nuestra época, inicia como un tumor secundario a mutaciones en genes supresores de tumor y proto-oncogenes (3). Esta patología puede originarse mediante la proliferación descontrolada de las células epiteliales lumbinales, las cuales se encuentran en los ductos transportadores de leche materna, y si aún no ha invadido el tejido circundante, es catalogado como estadio 0 del cáncer, o también conocido como *in situ* (4). Posteriormente, células cancerígenas pueden desarrollar la capacidad de realizar los procesos de migración e invasión celular generando un tumor maligno. Al proceso en el que las células cancerosas comienzan a invadir los tejidos circundantes y órganos distantes del tumor primario se le conoce como metástasis, como se muestra en la figura 1. Los principales órganos que suelen ser afectados por células tumorales mamarias metastásicas son los pulmones, el hígado, el cerebro y los huesos (5). En las últimas décadas se ha mantenido la tendencia al incremento en el número de diagnósticos por cáncer de mama, los pacientes con tumores catalogados en estadio IV cuentan con una esperanza de vida de 5 a 10 años (6).

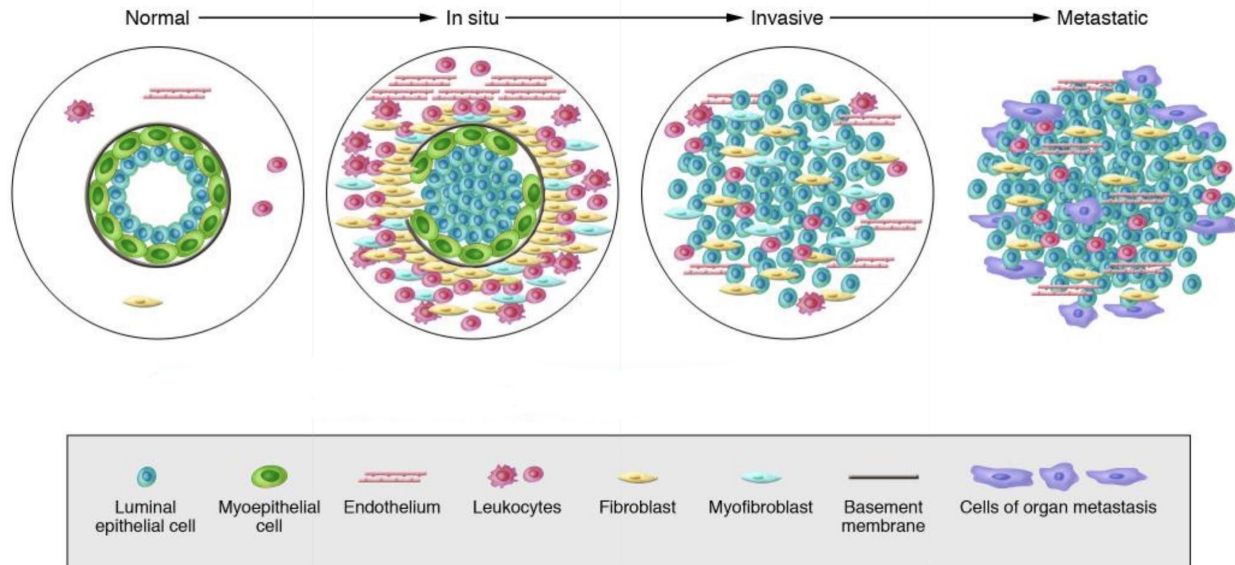


Figura 1. Modelo representativo de la progresión tumoral mamaria. Representación esquemática de un lumen normal, carcinoma *in situ*, invasivo y metastásico. Un conducto normal está conformado por una bicapa de células luminales y mioepiteliales rodeados de una membrana basal. Un carcinoma *in situ* presenta proliferación descontrolada de células tumorales, generando una reducción en el número de células mioepiteliales y un aumento en la infiltración de leucocitos, eventos asociados a la degradación parcial de la membrana basal. En un tumor invasivo han desaparecido las células mioepiteliales y se ha degradado la membrana basal. Un tumor metastásico mamario es aquel desarrollado en un órgano distante del tumor primario (Tomada de Polyak. J Clin Invest. 2007).

IV.2. Etiología del cáncer de mama

Se conocen múltiples inductores que propician el desarrollo de cáncer de mama, siendo importante las mutaciones genéticas que conducen a la aparición de diversas alteraciones en genes moduladores del ciclo celular (3). Adicionalmente, existen distintos factores de riesgo relacionados con el estilo de vida que favorecen la evolución de cáncer mamario, entre los que se encuentran la obesidad, falta de ejercicio y dieta desbalanceada entre otros (7-9).

IV.2.1. Factores de riesgo reproductivo y hormonales.

Evidencia concreta ha asociado factores de riesgo reproductivos y hormonales con el favorecimiento del desarrollo de cáncer mamario, entre los que se encuentran: una menarca temprana (anterior a los 11 años), una menopausia tardía (posterior a los 55 años) y un embarazo postergado (después de los 30 años) (10). Por otro lado, un estudio realizado en Asia en el que participaron mujeres vietnamitas asoció significativamente la alta densidad de la mama y un bajo índice de masa corporal, con un elevado riesgo de desarrollar dicha neoplasia mamaria (11).

IV.2.2. Factores de riesgo genéticos.

Existen mutaciones genéticas las cuales pueden ser heredadas (cáncer de mama familiar), generando fenotipos tumorales altamente agresivos como las existentes en los genes BRCA1 y BRCA2, los cuales se asocian con el riesgo del desarrollo tumoral mamario (12, 13). BRCA1 es un gen que codifica para una proteína nuclear de 220 kDa, cuenta con un dominio de dedos de zinc en su extremo amino-terminal y con un extremo carboxilo-terminal que funciona como co-activador transcripcional. BRCA2 se ha visto implicado en la membrana citoplasmática de forma similar al BRCA1, este no presenta similitud con ningún otro gen y codifica para una proteína de 384 kDa, es capaz de interactuar con BRCA1 participando en procesos de reparación del ADN por recombinación. Las mutaciones genéticas en BRCA1 y BRCA2 están presentes hasta en un 30% de pacientes diagnosticados con cáncer de mama (12, 13).

Mutaciones en el receptor Her2/neu son asociadas a tumores mamarios agresivos; Her2/neu es una glicoproteína transmembrana con actividad de tirosina cinasa, es miembro de la familia de receptores de factor de crecimiento epidermal y se encuentra implicada en la regulación de vías de señalización asociadas a supervivencia, diferenciación y crecimiento celular. Además, la sobreexpresión de Her2 está involucrada en el desarrollo de tumores altamente agresivos en edad temprana,

estadio tumoral III-IV o un mayor tamaño del tumor, presentando una alta probabilidad de ser triple negativo (14).

IV.2.3. Factores de riesgo relacionados con el estilo de vida.

Actualmente se relacionan diversos factores de riesgo asociados con el estilo de vida y el desarrollo de cáncer de mama en países desarrollados, destacando la obesidad por su alto nivel de prevalencia (7).

Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), en el año 2017 México ocupó el 2do lugar en obesidad a nivel mundial, presentando una prevalencia de 32.4% (15). En las últimas décadas se ha fortalecido la asociación entre el cáncer de mama y la obesidad, pues existe evidencia que el tejido adiposo está relacionado con aspectos como la inflamación, regulación de factores anticancerígenos, angiogénesis tumoral, crecimiento del tumor y metástasis (15).

Por otro lado, en Estados Unidos de Norte América se ha encontrado una relación muy estrecha entre la obesidad y la postmenopausia, que en conjunto, elevan el riesgo de desarrollar cáncer de mama hasta en un 30% (16). Además, existe evidencia en pacientes de cáncer mamario, la cual demuestra que por cada 2.5 kg de sobrepeso, se observa un incrementando de 13% en la tasa de mortalidad (17).

IV.3. Epidemiología del cáncer mamario.

El cáncer de mama es el carcinoma más común en mujeres a nivel mundial, reportando 14 millones de nuevos casos diagnosticados en el año 2012, sumado a esto, se prevé un incremento estimando a 20 millones de diagnósticos nuevos para el año 2030 (18). Alrededor del mundo, el cáncer mamario es la primera causa de muerte por neoplasias en mujeres, superando la cifra de 500,000 casos anuales con un promedio mayor de fallecimientos en países desarrollados y de nivel socioeconómico alto. Así mismo, el riesgo de morir es más elevado en países con bajo nivel económico aunado al diagnóstico tardío de la enfermedad. Este fenómeno se ve asociado a la falta

de accesibilidad para la población, deficiencia en los servicios de salud para la detección temprana, falta de tratamiento y control de la patología (19).

En México, datos generados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), destacó al cáncer de mama como principal morbilidad en mujeres mayores de 20 años, asignándole el segundo lugar como causa de decesos por neoplasia en mujeres (20). Alarmantemente, se dio a conocer que cada 9 minutos se diagnostica un nuevo caso en México, existiendo más de 60,000 mujeres mayores de 13 años que sufren dicha alteración de la salud (21).

A partir del año 2006, el rango de edad en la que se ha diagnosticado el cáncer de mama aumentó, ya que por primera vez fue diagnosticado en una paciente con 13 años de edad, además, el número de decesos incrementó superando al cáncer cérvico-uterino (22).

De acuerdo a datos del Censo General de Población y Vivienda (INEGI, 2010) el 27% de la población total del país se encuentra afectada por dicha patología, la cual es comprendida por mujeres que están en edad reproductiva dentro del rango de 20 a 59 años, así mismo, en ese mismo año se dio a conocer la cantidad de más de 5,000 casos nuevos diagnosticados con este padecimiento, debido al comportamiento del cáncer de mama en lapsos cortos de tiempo, es que se ha convertido en un problema de salud pública (23). Además, un análisis registró una tendencia al incremento a partir del año 2000, ubicando a Baja California dentro de los primeros 5 estados con mayor tasa de morbilidad (24).

V. Progresión tumoral mamaria: Papel de FAK, Src y MMP-2 y -9.

V.1. FAK, Src y su relación con la migración e invasión tumoral mamaria.

Las células desarrollan diversos tipos de procesos biológicos, por ejemplo, se llevan a cabo la comunicación, división, proliferación o apoptosis celular. Estos procesos son realizados mediante señales autocrinas, paracrinas y endocrinas, en las que múltiples moléculas son captadas por receptores celulares, modulando la activación de diferentes vías de señalización (25).

En el proceso de migración celular se requiere de un conjunto de mecanismos altamente coordinados, como la participación de ligandos unidos a receptores de membrana celular, proteínas reguladoras de transducción de señales, proteínas constituyentes del citoesqueleto, integrinas y la adecuada interacción con componentes de la matriz extracelular (26). Las uniones de adhesión focal son uniones de tipo adherente, conectan el citoesqueleto de actina con la matriz extracelular mediante proteínas transmembranales ubicadas en la membrana citoplasmática llamadas integrinas (27). Como se muestra en la Fig. 2, el dominio extracelular de las integrinas entra en contacto con proteínas de la matriz extracelular, mientras que el dominio interno establece conexión con el citoesqueleto de actina, además, interactúan con diferentes tipos de proteínas entre las que se encuentran la tirosin-cinasa FAK (Focal Adhesion Kinase) y Src (28).

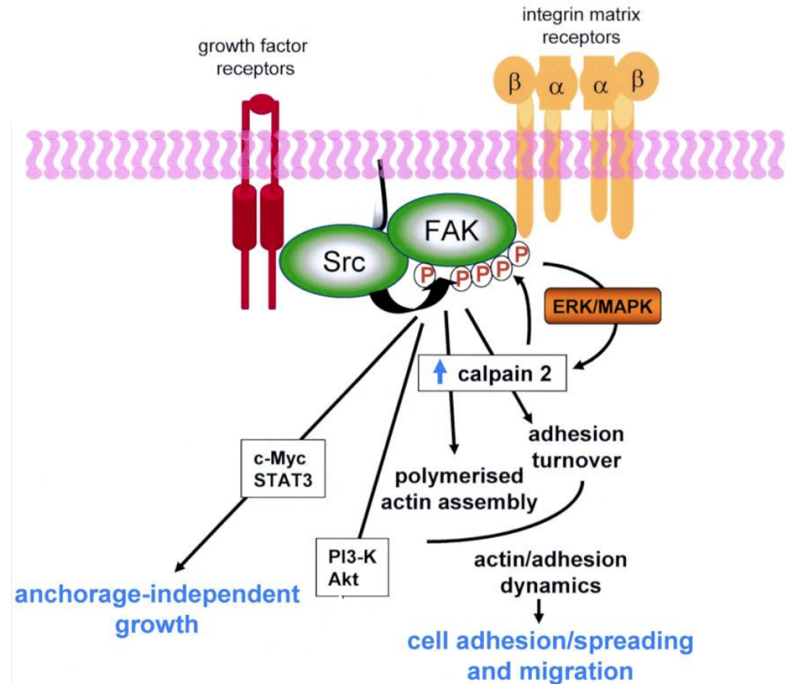


Figura 2. Participación de FAK y Src en la migración celular. El agrupamiento de integrinas y/o mediante la activación de receptores para factores de crecimiento, se induce la activación y fosforilación de FAK y Src, lo que conduce a cambios en la dinámica de polimerización de actina para promover la migración y dispersión celular. Finalmente, el proceso de migración culmina con la degradación de FAK por aumento de la actividad proteolítica de calpaína (Tomada y modificada de Westhoff MA, et al., 2004).

FAK se encuentra involucrada en la modulación de procesos celulares como proliferación, adhesión, migración e invasión celular (29). El agrupamiento de integrinas en la membrana plasmática favorece el reclutamiento, dimerización y fosforilación de FAK en el residuo Tyr-397, generando dominios ricos en fosfotirosina denominados SH2 (30). La proteína Src es reclutada a través de su dominio de unión a SH2, resultando en la fosforilación del residuo Tyr-418 de Src y subsecuente activación (31). Adicionalmente, Src activa es capaz de fosforilar a FAK en residuos Tyr-576 y Tyr-577 (32). La fosforilación y activación recíproca de las proteínas antes mencionadas inducen la activación de diversas vías de señalización (P130Cas/Rac, MAPK, PI3K/Akt) relacionadas con los procesos de migración, invasión, crecimiento y proliferación celular (33-35). Subsecuentemente, la activación de la vía P130Cas/Rac regula a

proteínas como Rac1 y Arp2/3, favoreciendo la dinámica molecular del citoesqueleto y formación de filamentos de actina (36). Por otro lado, cuando Grb2 se une al dominio SH2 de FAK, Grb2 fosforila y activa la cascada de MAPK cinasas (Sos, Ras, Raf-1, MEK) induciendo la translocación al núcleo de Erk 1/2 favoreciendo la fosforilación de factores de transcripción como Elk1, regulando así el proceso de proliferación celular (37).

Además, FAK y Src fosforiladas modulan la vía PI3K/Akt, iniciando con la unión del dominio p85 (dominio regulador) de PI3K a los dominios SH2 formados por FAK y Src, dando paso a la generación de PIP₃ y posterior fosforilación de Akt (38,39). Una vez Akt fosforilada, regula diversos procesos como lo son la inhibición de la apoptosis mediante FOXO o el crecimiento celular a través de mTOR (40,41).

En la patología del cáncer mamario, todos los procesos antes mencionados se presentan de manera no regulada, esto influye directamente en procesos como la migración e invasión celular, dando inicio al desarrollo de la metástasis, la cual es la principal característica presentada por pacientes con mal pronóstico de vida (42).

V.2. Participación de MMP-2 y MMP-9 en la invasión tumoral mamaria.

Las MMPs son enzimas con actividad de endopeptidasas dependientes de zinc, están involucradas en distintos aspectos fisiológicos y patológicos relacionados con la remodelación de la matriz extracelular (43). Las células humanas expresan 23 tipos de metaloproteinasas, de las cuales 17 se encuentran ancladas a la membrana celular, mientras que 6 son solubles, estas últimas se encuentran subdivididas en 4 familias: estromelisin, matrilinas, gelatinasas y colagenasas (44).

La familia de las colagenasas está compuesta por la MMP-2 y -9, existe evidencia la cual corrobora que se encuentran estrechamente relacionadas con el proceso de invasión, ya que cuentan con la particularidad de degradar colágeno tipo IV, el cual, es componente principal de la membrana basal (45). Los niveles de mRNA de MMP-9 y -14 son regulados por la vía PI3K/Akt a través de NFκB, en la que la MMP-14 se transloca a la membrana plasmática y conduce a la secreción y activación de MMP-2 hacia el espacio extracelular (46,47).

El microambiente tumoral es importante para el desarrollo de la patología, mediante inmunofluorescencia se ha demostrado que las células cancerígenas al igual que los adipocitos, son capaces de secretar MMPs predominando la de tipo -2 y -9 (48).

Al estudiar la invasión y metástasis, es necesario involucrar el análisis de la secreción de MMPs debido a que poseen la capacidad de degradar la matriz extracelular. Caracterizándose por jugar un papel importante en el desarrollo y progresión de los procesos de migración e invasión (49). No obstante, juegan un papel destacado en el proceso de invasión celular del tumor primario hacia el tejido circundante, debido a la capacidad de degradar la membrana basal, por lo que son asociadas a un mal pronóstico del paciente y tumores altamente agresivos (50).

VI. Propiedades del café y su relación con la salud humana.

El café es una de las bebidas con mayor consumo a nivel mundial, presentando un sabor y aroma muy característico, además de que puede ser adquirido fácilmente a muy bajo costo (51). Está compuesto por una amplia variedad de fitoquímicos que presentan propiedades antioxidantes (52). Anteriormente se creía que el consumo de café estaba asociado a elevar el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, sin embargo, en los últimos años se ha presentado evidencia de la relación entre el consumo de café con una mejor calidad de vida en pacientes con diversas patologías (53).

El café está constituido por: diterpenos (lípidos del café), kahweol, cafestol, ácidos fenólicos, ácido clorogénico y cafeína (54). De manera importante, se ha demostrado que el consumo de café está altamente relacionado con beneficios para la salud, como lo es la pérdida de peso o el control en el consumo de bebidas alcohólicas (55). Además, otros estudios asocian el consumo de café con la disminución en la progresión de distintas enfermedades crónico-degenerativas; como trastornos cardiovasculares, diabetes tipo 2, enfermedad de Parkinson y algunos tipos de cáncer (56,57). Es por eso, que el consumo de café se ha asociado a una reducción en el

desarrollo de diferentes neoplasias (56). Sin embargo, los mecanismos moleculares aún no han sido establecidos.

VII. Cafeína y su relación con el cáncer

Existe evidencia que ha demostrado que la cafeína (1,3,7-Trimetilxantina), presenta una relación favorable con algunos tratamientos en diversos padecimientos, entre ellos el cáncer (58).

Un estudio realizado por Masayuki Hayashi *et al.* Demostró que la administración intra-arterial de cafeína, potenció el efecto quimioterapéutico en una paciente japonesa que presentaba cáncer mamario (59). Por otro lado, en el año 2010 en un trabajo realizado por Wen-Hsin Liu y Long-Sen Chang, se observó que la cafeína induce la regulación a la baja de los niveles de mRNA de MMP-2 y -9 en células de leucemia humanas U937 (60). Además, Dong S, en colaboración con otros investigadores durante el año 2015, realizaron una investigación en la que demostraron que la cafeína a bajas concentraciones (100-600 μM) inhibe la migración e invasión celular en cultivos de las líneas tumorales hepáticas HepG2 y Huh7, a través de la modulación de la vía Akt (61). Mientras tanto, un estudio reciente realizado por Liu y su equipo de colaboradores, analizó el efecto de la cafeína en modelos de cáncer gástrico, demostrando que la cafeína induce una apoptosis sostenida *in vitro* utilizando las líneas celulares MGC-803 y SGC-7901 (62). Evidencia adicional confirmó que la cafeína regula el proceso de migración en células de glioma disminuyendo la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (p-FAK) en la línea celular humana U87MG (63).

Adicionalmente, estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de café se ha asociado con disminuir el riesgo de desarrollar cáncer de mama (64). De manera importante, entre más de 1000 moléculas que conforman al café, la cafeína se encuentra en alta concentración comparada con los demás componentes (54),

VIII. Metabolismo de lípidos y el cáncer

La evidencia que relaciona a la obesidad como un factor de riesgo en el desarrollo de múltiples neoplasias cada vez es más abundante, se observado la asociación con cáncer de endometrio, colorrectal, de riñón, esófago y cáncer mamario (65), en conjunto con un incremento en niveles de colesterol y la sobre expresión de receptores celulares para lipoproteínas de baja densidad (LDLR) favoreciendo la progresión tumoral (66). El receptor de LDL pertenece a una familia de receptores llamada familia LDLR que comprende a un grupo de receptores endocíticos ubicados en la membrana plasmática. Los receptores de esta familia comparten un dominio o motivo estructural común y entre sus miembros se cuenta LDLR, LRP1, LRP2, LRP6, ApoER2 y VLDLR, cuya función general es la endocitosis mediada por receptor de las lipoproteínas. Adicionalmente, la célula sensa los niveles de colesterol a través de una familia de proteínas denominadas SREBPs ("sterol regulatory element binding proteins") (66). Estas proteínas regulan a varios genes involucrados en la biosíntesis y captura del colesterol y reciben su nombre por unirse a una secuencia de 10 pb (5'-ATCACCCAC-3') denominada SRE-1 ("Sterol Regulatory Element-1") ubicada en la región 5' promotora de los genes del receptor de LDL y de las enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), farnesil difosfato sintasa y la escualeno sintasa (66,67).

Existen diversos factores involucrados en el proceso tumoral vinculados con el metabolismo del colesterol, uno de ellos se ha detectado entre la asociación del factor de transcripción SREBP-2 y la sobreexpresión de LDLR en el cáncer de hígado (67). De una manera similar, SREBP-2 mantiene niveles de expresión elevados en cáncer mamario, fenómenoA que se asocia con un pronóstico poco prometedor (68).

La proteína ABCG1 (ATP-binding cassette sub-family G member 1) es una proteína que es miembro de la súper familia de los transportadores con cassette de unión al ATP y es, junto a ABCA1, los principales responsables del eflujo de colesterol de los macrófagos hacia las HDL. Existe controversia en cuanto al papel de ABCG1 en cáncer. Estudios recientes demuestran que la expresión de ABCG1 es crucial para la sobrevivencia de células troncales iniciadoras de cáncer (cancer-initiating/stem cell)

presentes en glioma (69). Por otro lado, en modelos in vitro e in vivo de cáncer de colon, se demostró que la inhibición/deficiencia de la actividad de ABCG1 se asocia a mayor supervivencia por un mecanismo dependiente mitocondrial (70).

CD36 (FAT, fatty acid translocase) es una proteína integral de membrana miembro de la familia de receptores scavengers clase B implicada en apoptosis, reconocimiento inmunológico, inflamación, adhesión y captura de lípidos (71). CD36 es expresada en células endoteliales de la microvasculatura, células inmunológicas, y células tumorales, donde interactúa con múltiples ligandos, incluyendo LDL oxidadas y ácidos grasos de cadena larga. Particularmente, se ha reportado la sobre-expresión de CD36 en células de cáncer de ovario, glioblastoma y cáncer gástrico, mientras que en la microvasculatura y en el estroma su expresión se encuentra disminuida (71). Asimismo, se ha elucidado la participación de CD36 en procesos como metabolismo tumoral, crecimiento tumoral, resistencia a la quimioterapia y metástasis (71). Incluso, en algunas células tumorales mamarias se ha vinculado a CD36 con el crecimiento celular (72). Sin embargo, existe evidencia de que CD36 interactúa con integrinas de tipo $\alpha 5 \beta 1$ para la estabilización celular (73,74), razón por lo cual, es importante dilucidar su participación en procesos tumorales.

IX. Justificación

El cáncer de mama es uno de los problemas de salud más graves a nivel mundial, presentando cifras de mortalidad por encima de otras neoplasias, comúnmente es desarrollado por mujeres, sin embargo, existen casos en los que en personas de sexo masculino lo padecen. El cáncer mamario es la causa por la que fallece más de medio millón de mujeres anualmente alrededor del mundo, actualmente, 1 de cada 9 mujeres presentan riesgo de desarrollar cáncer de mama en algún momento de su vida. A partir del siglo XXI, la tendencia a desarrollar esta patología ha aumentado en comparación con otros problemas de la salud, en donde países industrializados presentan una prevalencia elevada en relación con países de bajo nivel socioeconómico (75,76).

Un estudio observacional donde participaron más de 40,000 mujeres demostró que al consumir más de 4 tazas de café hervido diariamente, se logra reducir el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Riesgo Relativo 0.52, 95% CI) comparado con las mujeres que no lo tomaban (55). Además, una investigación en la que participaron alrededor de 14,000 mujeres suecas mostró una disminución del riesgo de desarrollar cáncer mamario hasta en un 50% en las mujeres que consumían al menos 5 tazas de café al día (77). Sin embargo, no existen estudios previos en los que se demuestre la asociación entre la cafeína y los procesos de migración e invasión de las células de cáncer mamario triple negativo.

Por otro lado, la evidencia de la asociación entre el riesgo de desarrollar cáncer de mama y el sobrepeso cada vez es más extensa, donde desordenes metabólicos pudiesen ser los precursores de dicho estado físico. Las células tumorales cuentan con diversas mutaciones y funciones celulares no moduladas, las cuales aparentemente favorecen la progresión tumoral (65). Si embargo, no hay evidencia que describa el efecto de la cafeína sobre el proceso del metabolismo de lípidos en células tumorales mamarias altamente invasivas.

X. Hipótesis

El tratamiento con cafeína induce la disminución de las capacidades de migración e invasión en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativo, a través de la inhibición de FAK y Src. Además, la cafeína modula el metabolismo de lípidos mediante la disminución del LDLR en la línea celular mamaria MDA-MB-231.

XI. Objetivos

XI.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de la cafeína en los procesos de migración e invasión celular en la línea tumoral invasiva MDA-MB-231. A su vez, el análisis de la cafeína sobre el proceso del metabolismo de lípidos mediado por LDLR.

XI.2. Objetivos particulares.

1. Evaluar el papel de la cafeína sobre la capacidad migratoria de las células tumorales MDA-MB-231.
2. Determinar el efecto de la cafeína sobre la capacidad invasiva en células MDA-MB-231.
3. Estudiar la secreción de MMP-2 y -9 en células MDA-MB-231 tratadas con cafeína.
4. Determinar los niveles de fosforilación de las proteínas FAK (p-FAK-Tyr³⁹⁷) y Src (p-Src-Tyr⁴¹⁸) en células MDA-MB-231 tratadas con cafeína.
5. Analizar el efecto de la cafeína sobre el metabolismo de lípidos mediado por LDLR, la expresión de SREBP2, ABCG1 y CD36 en células tumorales MDA-MB-231.

XII. Materiales y métodos

XII.1. Material biológico

Material biológico	Características
MDA-MB-231	Línea celular humana invasiva de cáncer mamario

XII.2. Anticuerpos

Anti-Actina
Anti-FAK
Anti-p-FAK (Tyr ³⁹⁷)
Anti-MMP-2 (H-76)
Anti-Src
Anti-Src (Tyr ⁴¹⁸)
Anti-MMP-9 (H-129)
Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (HRP)
Anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (HRP)
Anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa (HRP)
Anti-LDLR
Anti-SREBP-2
Anti-ABCG1
Anti-CD36

XII.3. Cultivo celular

La línea celular de cáncer mamario MDA-MB-231 se cultivo en cajas de 100 y 35 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C.

XII.4. Ensayos de cierre de herida

Una vez que los cultivos celulares de la línea MDA-MB-231 alcanzaron el 100% de confluencia, se colocaron en supresión con medio DMEM sin suero durante 24 horas, previo a la estimulación fueron pre-tratadas durante 2 horas con mitomicina C (8 µg/ml) para inhibir la proliferación celular. Después de la supresión, se llevó a cabo la ralladura o “herida” utilizando una punta estéril con capacidad de 200 µL, posteriormente se lavaron los cultivos en dos ocasiones con PBS 1X (K₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, a pH 7.2) removiendo las células suspendidas. A continuación, las células MDA-MB-231 fueron tratadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de cafeína (0, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 mM) o alternativamente con SFB al 5%. Posterior a las 24 horas de estímulo, las células fueron fijadas con etanol frío (-70°C durante 10 minutos y teñidas con azul de comassie durante 5 minutos. La migración celular dentro de la herida fue fotografiada usando un microscopio invertido acoplado a cámara.

XII.5. Zimografía

Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados a concentraciones crecientes de cafeína durante diferentes tiempos (etanol y PDB serán utilizados como controles positivos de la secreción de MMP-2 y -9). Los medios condicionados fueron colectados y concentrados usando filtros centricon (Millipore) a 2,500 rpm durante 2 horas. Posteriormente, volúmenes iguales de medio condicionado concentrado se mezclaron con buffer de muestra (SDS 2.5%, sacarosa 1% y rojo de fenol 4 µg/ml) sin agentes reductores, y fueron cargados en geles de acrilamida al 8% copolimerizados

con gelatina a 1 mg/ml. Los geles obtenidos fueron lavados dos veces en Tritón X-100 al 2.5% e incubados en buffer de activación (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7.4) a 37°C durante 12 horas. Al finalizar los lavados, los geles fueron fijados y teñidos en solución Azul de Coomassie Brillante G-250, ácido acético al 10% y metanol al 30%. La actividad proteolítica fue detectada como bandas claras contra el fondo teñido de sustrato no digerido.

XII.6. Inmunodetección

Los lisados celulares se cuantificaron con el método de micro-bradford. Posteriormente, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de PVDF. Una vez culminada la electroforesis, las membranas de PVDF se bloquearon con leche al 5% durante 1 hora, para después colocar el anticuerpo correspondiente (dilución 1:1,000) e incubarlo durante toda la noche a 4°C. Al transcurrir un tiempo de 24 horas, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.05% y se incubaron con el anticuerpo secundario especie-específico peroxidado (dilución 1:10,000) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.05% culminando con el revelado mediante quimioluminiscencia (ECL). Las autorradiografías fueron escaneadas y las bandas cuantificadas mediante el programa ImageJ 1.44p.

XII.7. Ensayo de invasión en cámara de Boyden

Los ensayos de invasión se realizaron en cámaras de Boyden con filtros que presentan poros de 8 μm de diámetro. Se inició colocando 15 μL de Matrigel BD en la parte superior de los insertos de la cámara y en la parte inferior se colocó un volumen final de 600 μl de medio DMEM con las diferentes condiciones de estimulación (cafeína 250 μM y SFB 10%). Las células MDA-MB-231 se sometieron a supresión de suero durante 24 horas y fueron pre-tratadas con mitomicina C durante 2 horas para inhibir la proliferación celular. Al cumplir las 2 horas de exposición a la Mitomicina C, las células fueron desprendidas con tripsina 0.25% y verseno 0.02%, realizándose 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. Posteriormente, las células se incubaron durante 48 horas a 37°C, tras lo cual, el medio del compartimiento superior e inferior fue retirado, y las células fueron fijadas con metanol frío durante 5 minutos. Utilizando un hisopo de algodón, se removieron a las células de la parte superior del inserto que no lograron invadir. Después, las células presentes en la parte inferior fueron teñidas con cristal violeta 0.1% durante 10 minutos en agitación. Para así, lavar las membranas 4 veces en agua bidestilada, procediendo a desteñirlas con 200 μl de ácido acético al 10%. Obteniendo la solución resultante, se analizó empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Los resultados fueron graficados como promedio de las absorbancias.

XII.8. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como promedio \pm D.E. Los datos se analizaron estadísticamente usando la prueba ANOVA de una vía comparada mediante la prueba múltiple de Dunnett. La probabilidad estadística $P < 0.05$ fue considerada significativa.

XIII. Resultados

XIII.1. Cafeína promueve la disminución en la capacidad migratoria de células de la línea MDA-MB-231.

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide natural encontrado en alimentos y frutos de diversos tipos de plantas, en el café particularmente se presenta como uno de sus principales componentes (78). Se ha demostrado que, en células cancerosas mamarias la cafeína modula la proliferación y el ciclo celular (79). Además, se ha confirmado que cafeína induce efectos biológicos en cultivos celulares de neuroblastoma mediante la unión al receptor de adenosina A_{2A} (80). Por ello, evaluamos el efecto de la cafeína en cultivos de la línea celular invasiva MDA-MB-231. Para cumplir con este objetivo nuestro equipo de trabajo mantuvo cultivos confluentes de células MDA-MB-231, una vez alcanzado el 100% de confluencia se procedió a realizar el ensayo de cierre de herida para posteriormente, estimular los cultivos celulares en presencia o ausencia de cafeína a diferentes concentraciones (0-5 mM). Como se muestra en la Fig. 3A, la cafeína promueve una regulación negativa de la migración, observándose el mayor efecto una concentración de 5 mM de cafeína en un periodo de 24 horas de estímulo. En la Fig. 3B se puede observar el análisis estadístico de al menos tres experimentos independientes, en los que se corrobora que existe una diferencia significativa de los experimentos realizados en comparación con el grupo control.

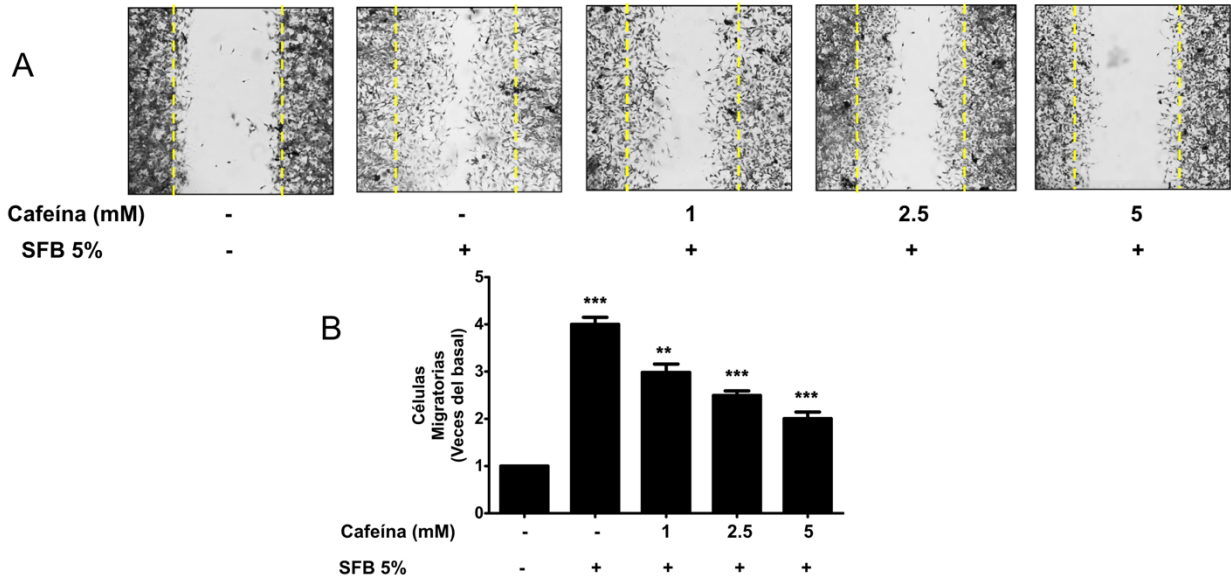


Figura 3. La cafeína inhibe la migración de las células tumorales mamarias invasivas MDA-MB-231. Panel A. Se realizó una ralladura a los cultivos confluentes de células MDA-MB-231, posteriormente fueron estimulados durante 24 horas con o sin cafeína a diferentes concentraciones. Las fotografías fueron tomadas una vez concluidas las 24 horas posterior al estímulo. Panel B. La gráfica representa la media \pm D.E. De al menos tres experimentos independientes y son expresados como las veces de migración con respecto al control. Los asteriscos denotan significancia estadística. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ mediante ANOVA de una vía.

XIII.2. La cafeína a bajas concentraciones disminuye la capacidad migratoria en la línea MDA-MB-231.

En el ensayo previo, se demostró la regulación del proceso de migración a diferentes concentraciones de cafeína (0-5 mM) en células MDA-MB-231. Sin embargo, un estudio realizado en el año 2015 con células cancerígenas hepáticas demostró que la cafeína presenta un efecto biológico a bajas concentraciones ($<412 \mu\text{M}$) logrando regular procesos como proliferación, migración, invasión y progresión tumoral (62). Nuestro grupo de trabajo decidió utilizar una concentración de cafeína aún más baja ($250 \mu\text{M}$), las cuales pueden ser fisiológicamente alcanzables (81). Para lo cual, analizamos el efecto de la cafeína a bajas concentraciones en células MDA-MB-231. De esta manera, empleando la metodología del ensayo de cierre de herida, cultivos 100% confluentes de células MDA-MB-231 fueron expuestos a cafeína a bajas concentraciones (0-1000 μM), después de un lapso de 48 horas de estímulo, las células fueron fijadas para el análisis. En la figura 4A se muestra que la cafeína disminuye la migración en células MDA-MB-231, mostrando un máximo efecto inhibitorio de la migración a $250 \mu\text{M}$. En la Fig. 4B se puede observar el análisis estadístico de al menos tres experimentos independientes, en los que se corrobora que existe una diferencia significativa de los experimentos realizados en comparación con el grupo control.

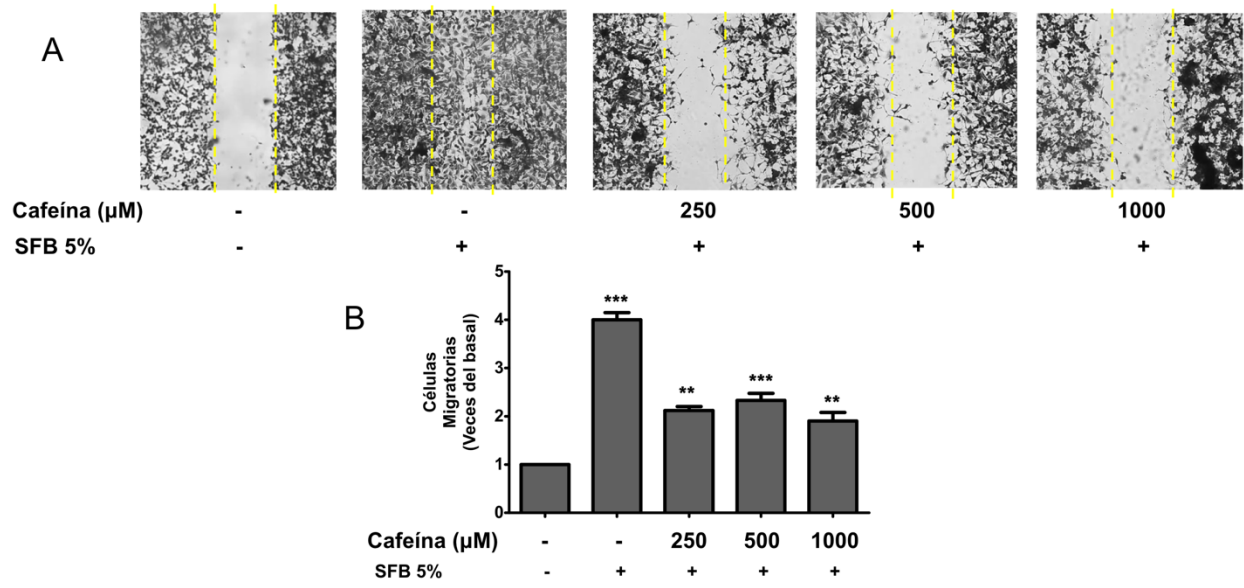


Figura 4. La cafeína inhibe la migración de células tumorales mamarias invasivas MDA-MB-231 a bajas concentraciones. Panel A. Se realizó una ralladura a cultivos celulares MDA-MB-231 confluentes. Posteriormente, se prosiguió con estímulos de 48 horas en ausencia o presencia de cafeína a diferentes concentraciones. Las fotografías fueron tomadas 48 horas después de recibir los diversos estímulos. Panel B. Las gráficas representan la media \pm D.E. De al menos tres experimentos independientes y son expresados como las veces de migración con respecto al control. Los asteriscos denotan significancia estadística. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ mediante ANOVA de una vía.

XIII.3. La cafeína disminuye los niveles de fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) en la línea MDA-MB-231.

FAK es una proteína tirosina cinasa no receptora con participación en adhesiones focales, está involucrada en la interacción entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina (82). Existe evidencia que muestra la relación entre procesos tumorales y FAK (83). La fosforilación en su residuo de tirosina (p-FAK-Tyr³⁹⁷) es indicador de su máxima actividad catalítica (31-32), desencadenando la activación de diferentes vías río abajo de la cascada de señalización (35, 36, 39) asociadas a diversos procesos tumorales (34). Por lo cual, determinamos analizar el efecto de la cafeína sobre la fosforilación de FAK en la línea tumoral mamaria MDA-MB-231. Para ello, obtuvimos los extractos celulares de cultivos confluentes de la línea celular invasiva MDA-MB-231 en presencia y en ausencia de cafeína, y los analizamos mediante la técnica de western blot. Nuestros resultados demuestran que cafeína induce una disminución en el nivel de fosforilación de FAK (p-FAK-Tyr³⁹⁷) dependiente del tiempo (Fig. 5A). El análisis estadístico y densitométrico corrobora que el nivel de fosforilación disminuyó hasta 2 veces con respecto a grupo tratado con SFB al 5% (Fig. 5B).

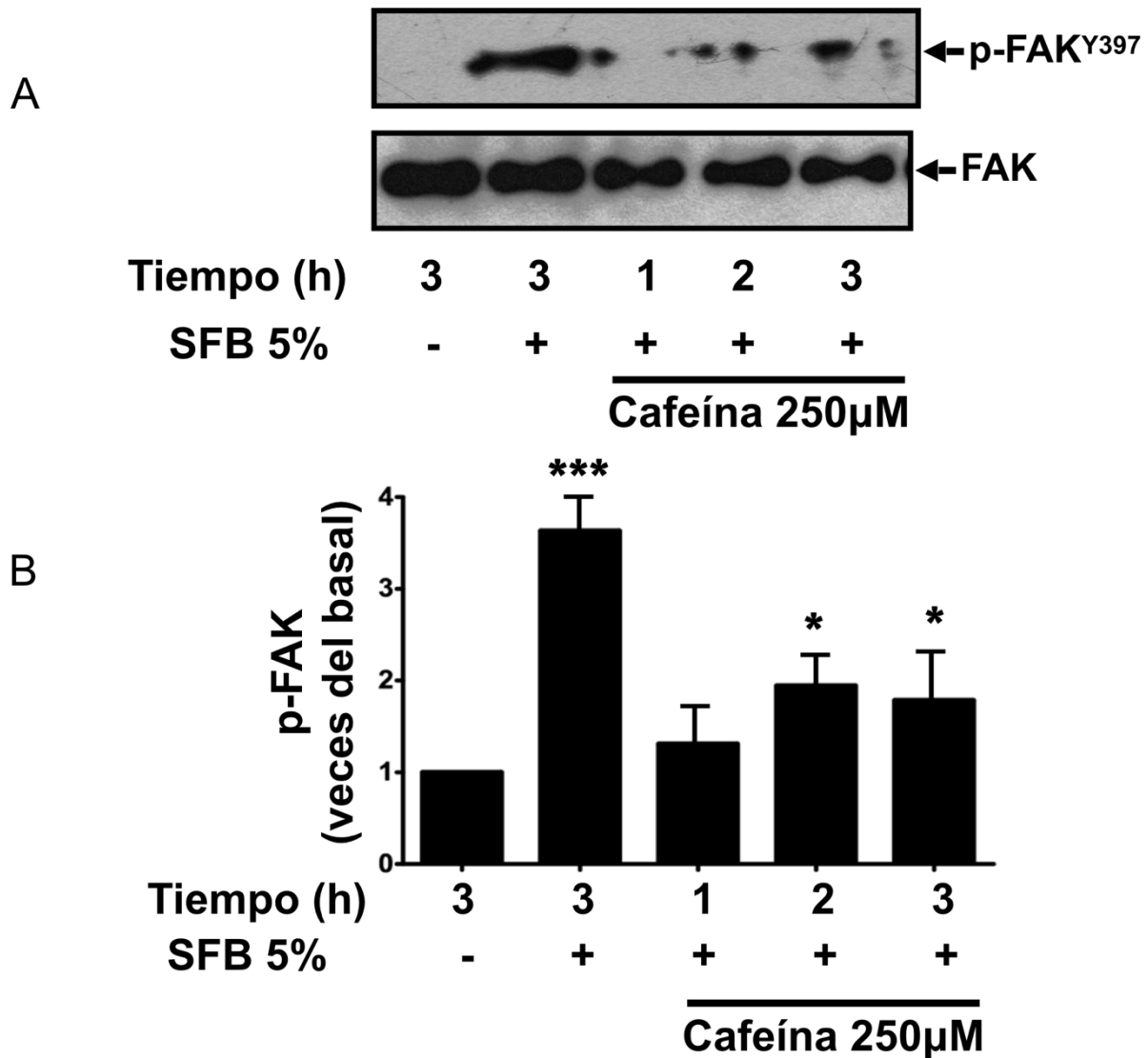


Figura 5. La cafeína a baja concentración (250 μM) disminuye la fosforilación de la cinasa de adhesión focal FAK en células tumorales mamarias invasivas MDA-MB-231. Panel A. Los cultivos de células MDA-MB-231 fueron estimulados a los tiempos indicados con o sin cafeína. Los extractos celulares fueron analizados mediante la técnica de Western Blot utilizando anticuerpo Anti-FAK o anticuerpo Anti-p-FAK³⁹⁷. Panel B. Las gráficas representan la media \pm D.E. de al menos tres experimentos independientes y son expresados como las veces de incremento en la expresión de p-FAK³⁹⁷ con respecto al control. Los asteriscos denotan significancia estadística. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ mediante ANOVA de una vía.

XIII.4. Cafeína disminuye los niveles de fosforilación de Src en la línea MDA-MB-231.

La proteína Src pertenece a una familia de cinasas asociadas a procesos tumorales en diversos tipos de cáncer (84). La activación y fosforilación de Src (p-Src-Tyr⁴¹⁸) se encuentra íntimamente relacionada a la fosforilación previa de FAK en Tyr³⁹⁷. La fosforilación de FAK genera dominios SH2 que son reconocidos por Src, favoreciendo la fosforilación de Src en su residuo Tyr⁴¹⁸ (85). Src fosforilado (p-Src-Tyr⁴¹⁸) fosforila a FAK en residuos adicionales (p-FAK-Tyr⁵⁷⁶ y p-FAK-Tyr⁵⁷⁷) (32), desencadenando diversas vías de señalización asociadas a procesos tumorales como lo son la inhibición de apoptosis, migración e invasión (35,36,39). Por esto, se evaluaron los niveles de Src fosforilada en la línea celular tumoral MDA-MB-231 con estímulos de cafeína y en ausencia de esta. Para ello, lisados celulares obtenidos de cultivos confluentes que fueron estimulados en ausencia y presencia de cafeína (250µM) a diferentes tiempos, fueron procesadas mediante la técnica de western blot para el posterior análisis de los niveles de fosforilación de Src (p-Src-Tyr⁴¹⁸). Nuestro grupo demostró que la cafeína disminuye el nivel de fosforilación de Src (p-Src-Tyr⁴¹⁸) en las muestras tratadas con cafeína a la concentración de 250 µM (Fig. 6A). En la Fig. 6B, el análisis estadístico muestra que la mayor disminución del nivel de fosforilación se observa en la muestra que recibe el estímulo con cafeína durante 1 hora.

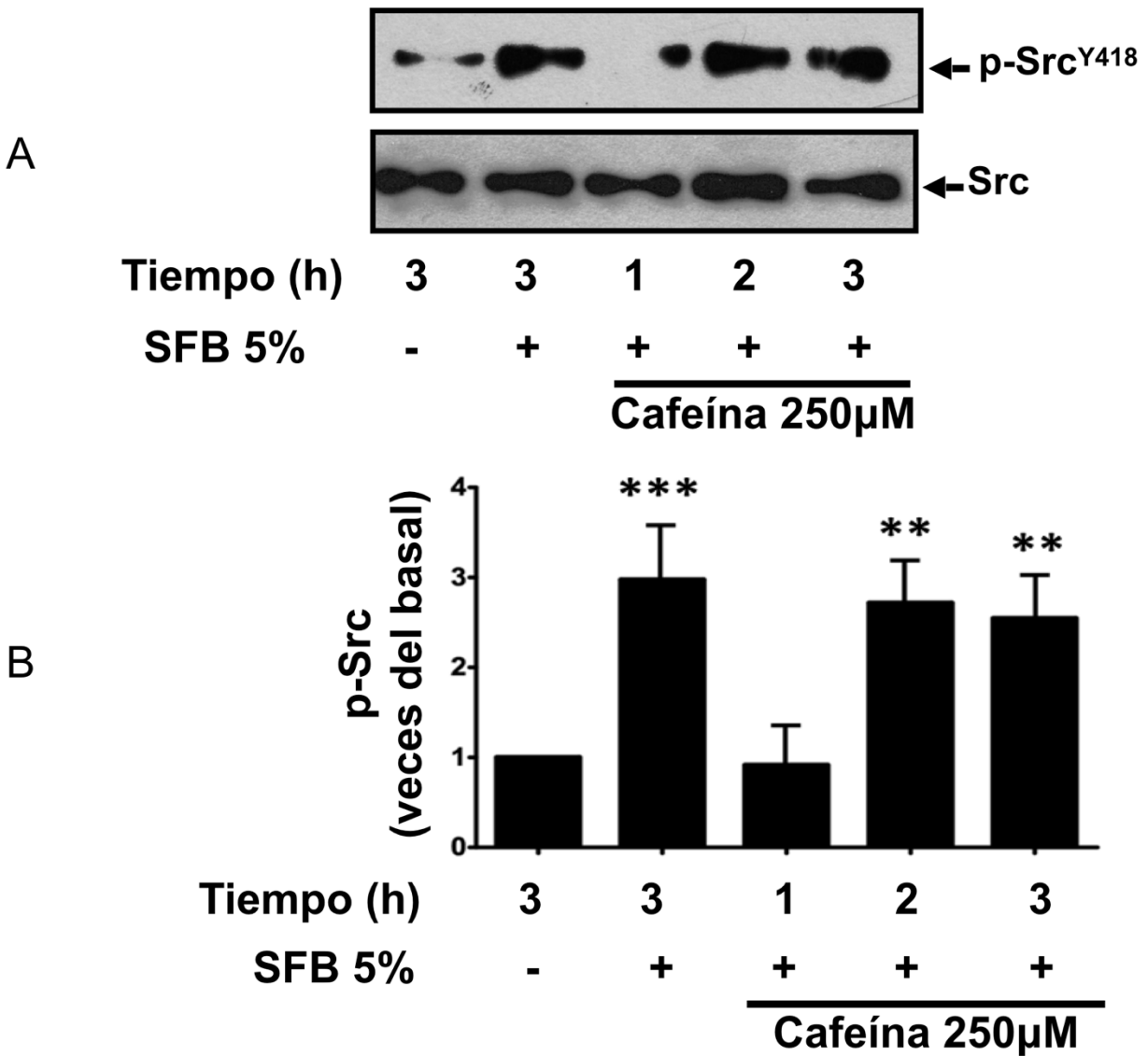


Figura 6. La cafeína a baja concentración (250 μM) disminuye la fosforilación de Src en células tumorales mamarias invasivas MDA-MB-231. Panel A. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron estimulados a diferentes tiempos en ausencia o presencia de cafeína. Los extractos celulares fueron analizados mediante la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-Src o anticuerpo Anti-p-Src⁴¹⁸. Panel B. Las gráficas representan la media ±D.E. De al menos tres experimentos independientes y son expresados como veces de incremento en la expresión de p-Src⁴¹⁸ con respecto al control. Los asteriscos denotan significancia estadística. **P<0.01, ***P<0.001 mediante ANOVA de una vía.

XIII.5. La cafeína a bajas concentraciones no promueve la regulación de los niveles de secreción de MMP-2 y -9 en la línea celular MDA-MB-231

Las MMPs se encuentran clasificadas en 5 familias, la MMP-2 y -9 pertenecen a la familia de las colagenasas, presentan un papel importante en la remodelación de la matriz extracelular, dada su capacidad de un componente importante de la membrana basal, colágeno tipo IV (86). Sin embargo, en modelos tumorales se han observado niveles de secreción elevados, favoreciendo el proceso de invasión y metástasis (87-89).

Con base en esto, decidimos evaluar la participación de la cafeína con respecto a los niveles de secreción de las MMP-2 y MMP-9 en células MDA-MB-231. Cultivos confluentes de MDA-MB-231 recibieron estímulo de cafeína (250-5000 μ M) durante 48 horas. Posteriormente, se obtuvo el sobrenadante para ser concentrado y analizado mediante el ensayo de zimografía en gelatina. Los resultados obtenidos demuestran que la cafeína no disminuye la secreción de MMP-2 y MMP-9 a la concentración de 250 μ M de cafeína (Figura 7A). Adicionalmente, nuestro equipo de trabajo realizó el análisis de los niveles de secreción de las MMP-2 y MMP-9 a diferentes concentraciones de cafeína durante un periodo de 48 horas, los resultados obtenidos (Figura 7B) sugieren la disminución de la secreción de la MMP-9 a 500 μ M, con una disminución paulatina dependiente de la concentración de cafeína a partir de 1000 μ M a 5000 μ M de la MMP-9. Estos resultados sugieren una posible disminución en los niveles de secreción de las MMP-2 y MMP-9 en presencia de altas concentraciones de cafeína.

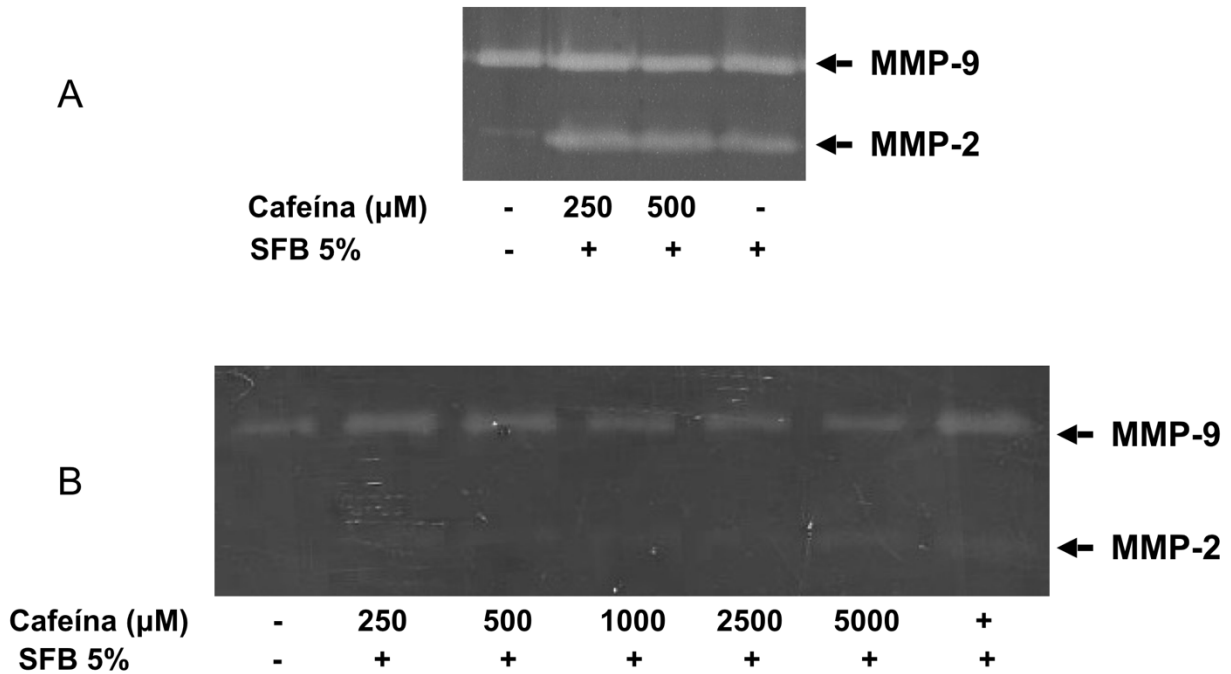


Figura 7. La cafeína regula la secreción de MMP-2 y MMP-9 en células tumorales mamarias invasivas MDA-MB-231 a altas concentraciones. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratadas en ausencia o presencia de cafeína a diferentes concentraciones durante un curso temporal de 48 horas. A continuación, se obtuvieron y concentraron los medios condicionados para ser analizados mediante zimografía con gelatina. A. Aparentemente, los cultivos que fueron expuestos a la concentración de cafeína de 500μM logran secretar menos MMP-9 en comparación con el grupo que recibió el estímulo único de SFB al 5%. B. El resultado sugiere que la secreción de la MMP-2 disminuye dependiendo de la concentración ascendente de cafeína, obtenida del medio condicionado de la línea celular MDA-MB-231.

XIII.6. La cafeína a bajas concentraciones disminuye la invasión en células MDA-MB-231

En los ensayos previos, se demostró que la cafeína induce una disminución de la migración a bajas concentraciones y una posible disminución en la secreción de las MMP-2 y MMP-9 en altas concentraciones (Figura 4, Figura 7). Estudios demuestran que, en diversos tipos de cáncer estos dos fenómenos se presentan de manera irregular dando inicio al proceso de metástasis, incluyendo al cáncer de mama (90-93). Por lo tanto, estudiamos el efecto de la cafeína sobre el proceso de invasión. Para cumplir con este objetivo, se llevó a cabo la técnica de cámaras de Boyden recubiertas con matrigel, colocando cultivos confluentes de la línea celular MDA-MB-231 en la parte superior de los insertos de las cámaras, mientras que en la parte inferior de las cámaras fueron colocados los estímulos en ausencia o presencia de cafeína durante un lapso de 24 horas. Una vez concluido el tiempo de exposición, la membrana resultante del fondo del inserto fue obtenida y teñida con cristal violeta. Como se observa en la Figura 8A, las células que recibieron el tratamiento con cafeína invaden en menor proporción comparado con las células que no recibieron el estímulo de cafeína. En la Figura 8B se aprecia cómo el espacio intercelular es mayor en el cultivo estimulado con cafeína, además de que se logra apreciar una menor cantidad de células al compararlo con el cultivo que no recibió el tratamiento con cafeína. Por tanto, demostramos que la cafeína disminuye la invasión en células de la línea tumoral mamaria invasivas MDA-MB-231.

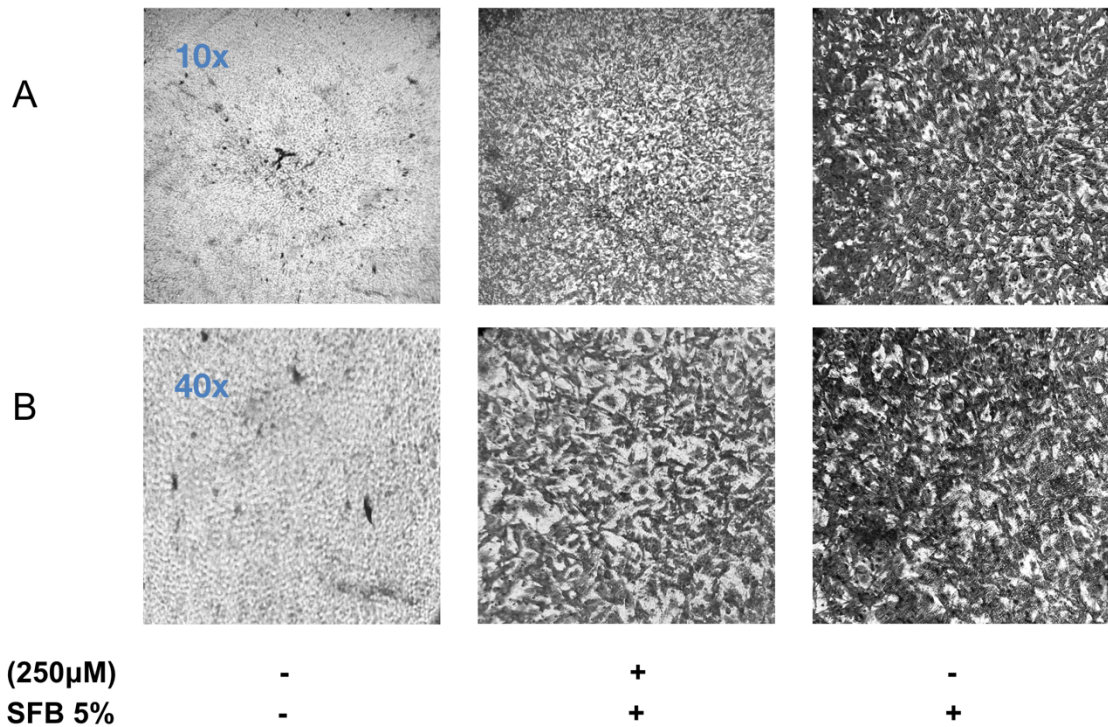


Figura 8. La cafeína a bajas concentraciones disminuye la invasión en células MDA-MB-231. Cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron tratados en ausencia o presencia de cafeína durante 48 horas. A continuación, la membrana resultante de los insertos cubiertos con matrigel fue obtenida y posteriormente teñida para su análisis. A. Fotografías tomadas con un aumento de 10X demuestran que cafeína a 250µM disminuye la invasión celular al compararla con la muestra ausente de cafeína. B. El resultado de las fotografías tomadas con un aumento de 40X muestra la disminución de las células que invaden, logrando apreciarse un mayor espacio intracelular comparado con el cultivo que no recibió el tratamiento con cafeína.

XIV. Cafeína y su relación con procesos metabólicos de la línea tumoral mamaria invasiva MDA-MB-231.

XIV.1. La cafeína disminuye aparentemente la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad.

La obesidad se encuentra estrechamente asociada al riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama (65). Los niveles elevados de colesterol, específicamente de lipoproteínas de baja densidad (LDL), asociados a una alta expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) favorecen el crecimiento tumoral mamario en modelos murinos con hiperlipidemia (66). Debido al efecto biológico que presenta la cafeína en procesos tumorales, evaluamos la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) en cultivos estimulados con cafeína durante 48 hora, para posteriormente obtener los extractos celulares y analizarlos mediante la técnica de Western Blot. En la Fig. 9A se muestra como los cultivos que fueron tratados con cafeína presentan una disminución en el nivel de expresión de LDLR dependiente del tiempo, lográndose observar el máximo efecto a las 36 horas posteriores al estímulo. Esta información sugiere que el nivel de LDLR fue disminuyendo al incrementar el tiempo de exposición presentando una pendiente con efecto máximo a las 36 horas, reduciéndose hasta en un 70% al ser comparado con la condición basal.

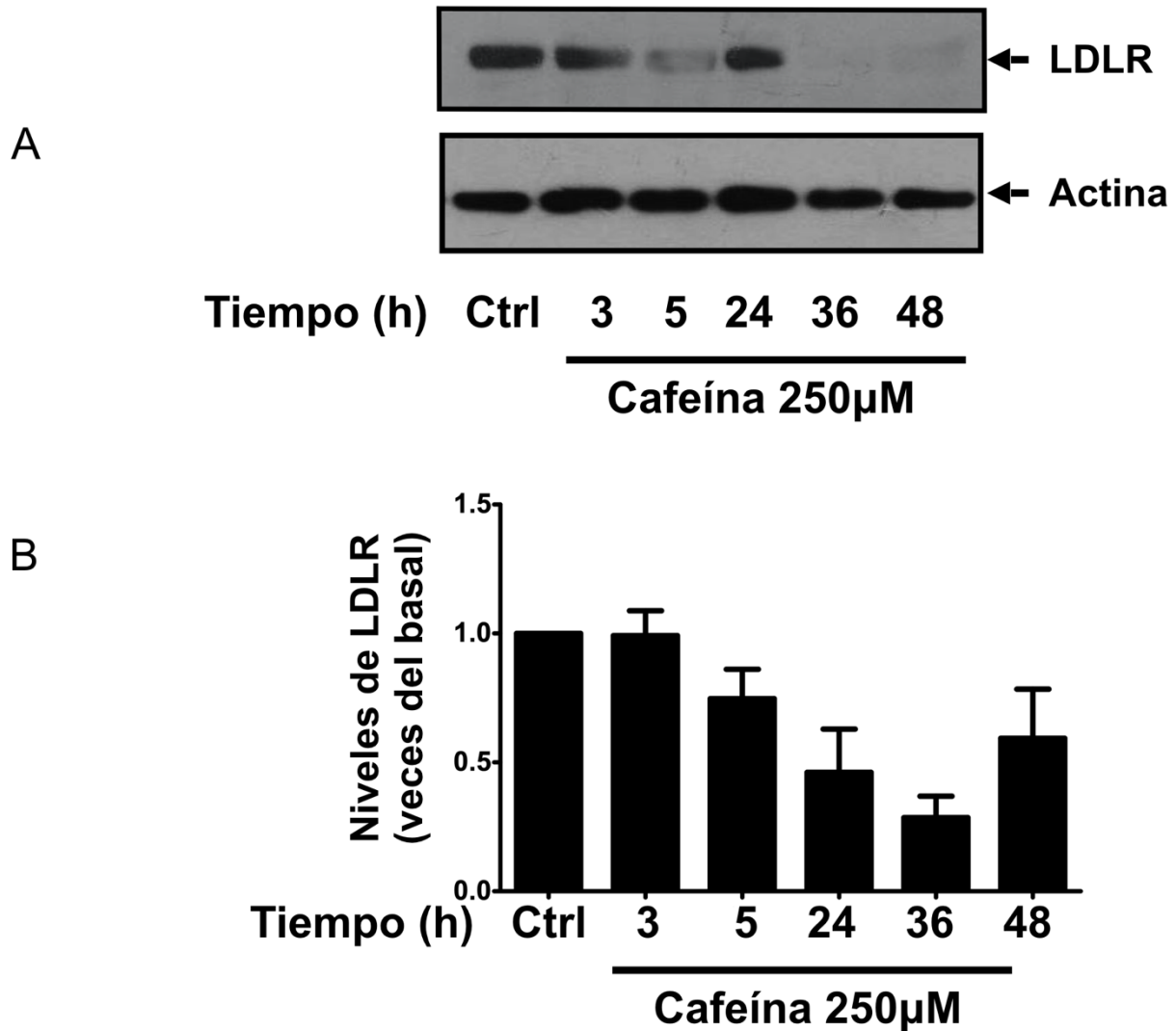


Figura 9. La cafeína disminuye la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad. Panel A. Los cultivos celulares MDA-MB-231 fueron estimulados a diferentes tiempos en ausencia o presencia de cafeína. Los extractos celulares fueron analizados mediante la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-LDLR o anticuerpo Anti-Actina. Panel B. Las gráficas representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes y son expresados como veces del basal con respecto al control.

XIV.2. La cafeína regula la expresión de SREBP-2 en células MDA-MB-231.

Un estudio realizado en el año 2015 por Dong y su grupo de trabajo, demostró la relación entre la expresión de LDLR con mecanismos tumorales dependientes de SREBP-2 en células de carcinoma hepatocelular (67). De manera interesante, se demostró que SREBP-2 se encuentra sobreexpresado en tejidos tumorales mamarios con respecto a tejido no tumoral, y se correlaciona con mal pronóstico (68). Debido a nuestros resultados obtenidos preliminarmente en los que cafeína disminuye la expresión del LDLR, decidimos evaluar la relación entre el efecto del tratamiento con cafeína y la expresión de SREBP-2 en células MDA-MB-231. Para ello, cultivos confluentes de células tumorales MDA-MB-231 fueron estimulados con cafeína 250 μ M mediante un curso temporal. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se extrajo el contenido proteico mediante buffer de lisis para su posterior análisis mediante inmunodetección. En el panel superior de la Fig. 10A, se aprecia un incremento en la expresión de SREBP-2 desde las 3 hasta las 36 h comparado con el grupo control, disminuyendo nuevamente a las 48 horas del tratamiento con cafeína. En el panel inferior de la Fig. 10A se muestra el control de carga, exponiendo a la membrana con anticuerpo anti-actina. La gráfica derivada del análisis de dos experimentos independientes sugiere un incremento en la expresión de SREBP-2 en las primeras 36 horas de tratamiento con cafeína, disminuyendo nuevamente a las 48 horas (Fig. 10B).

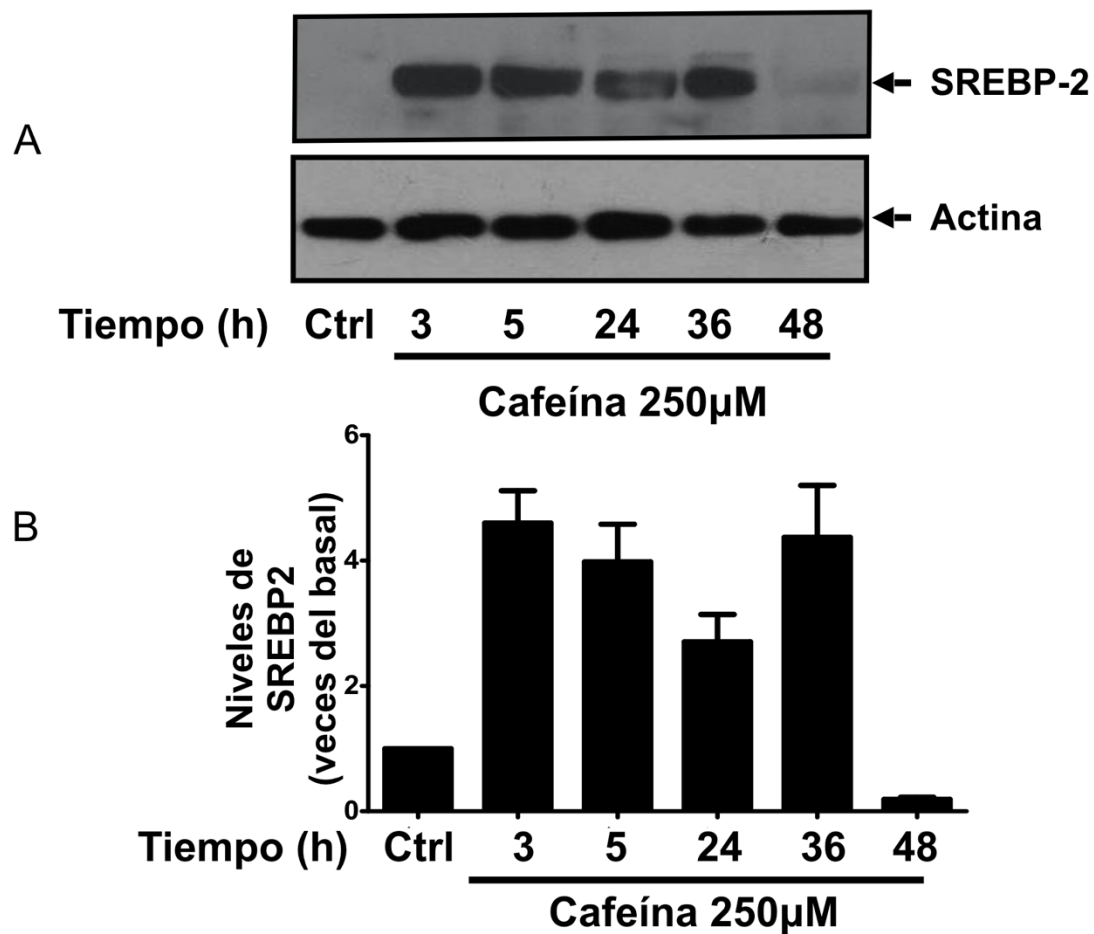


Figura 10. La cafeína regula la expresión de SREBP-2 en células MDA-MB-231. Panel A. Cultivos de células MDA-MB-231 fueron estimulados a diferentes tiempos en ausencia o presencia de cafeína. Los extractos celulares fueron analizados mediante la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-Actina o anticuerpo Anti-SREBP-2. Panel B. Las gráficas representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes y son expresados como veces del basal con respecto al control.

XIV.3. La cafeína promueve un incremento en la expresión de ABCG1 en células MDA-MB-231.

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer mamario. Además, en la obesidad se incrementan los niveles séricos de triacilglicéridos y colesterol, mientras que los altos niveles de colesterol están implicados indirectamente con el riesgo de desarrollar cáncer de mama (94). Asociado con el metabolismo celular, ABCG1 es una proteína transmembranal exportadora de colesterol del espacio intracelular al espacio extracelular (95), por lo que decidimos evaluar la expresión de este transportador en células MDA-MB-231 estimuladas con cafeína. Para evaluar este fenómeno, cultivos confluentes de células MDA-MB-231 fueron estimulados con cafeína a 250 μ M durante un curso temporal que va de 3 hasta las 48 horas. Posterior al estímulo, los cultivos fueron lisados para la obtención del extracto proteico y utilizados para el análisis de la expresión de ABCG1 mediante la técnica de Western Blot. El resultado mostrado en la Fig. 11A muestra como la expresión basal de la proteína ABCG1 es prácticamente inapreciable en el grupo control, sin embargo, cuando recibe el estímulo de cafeína se logra observar un incremento en la expresión de ABCG1. La Fig. 11B muestra la gráfica en la que se puede apreciar como a las 24 horas de tratamiento con cafeína la expresión de ABCG1 se incrementa hasta nueve veces en comparación con el grupo control. Este resultado sugiere que las células tumorales altamente invasivas MDA-MB-231 expresan ABCG1 bajo el tratamiento con cafeína.

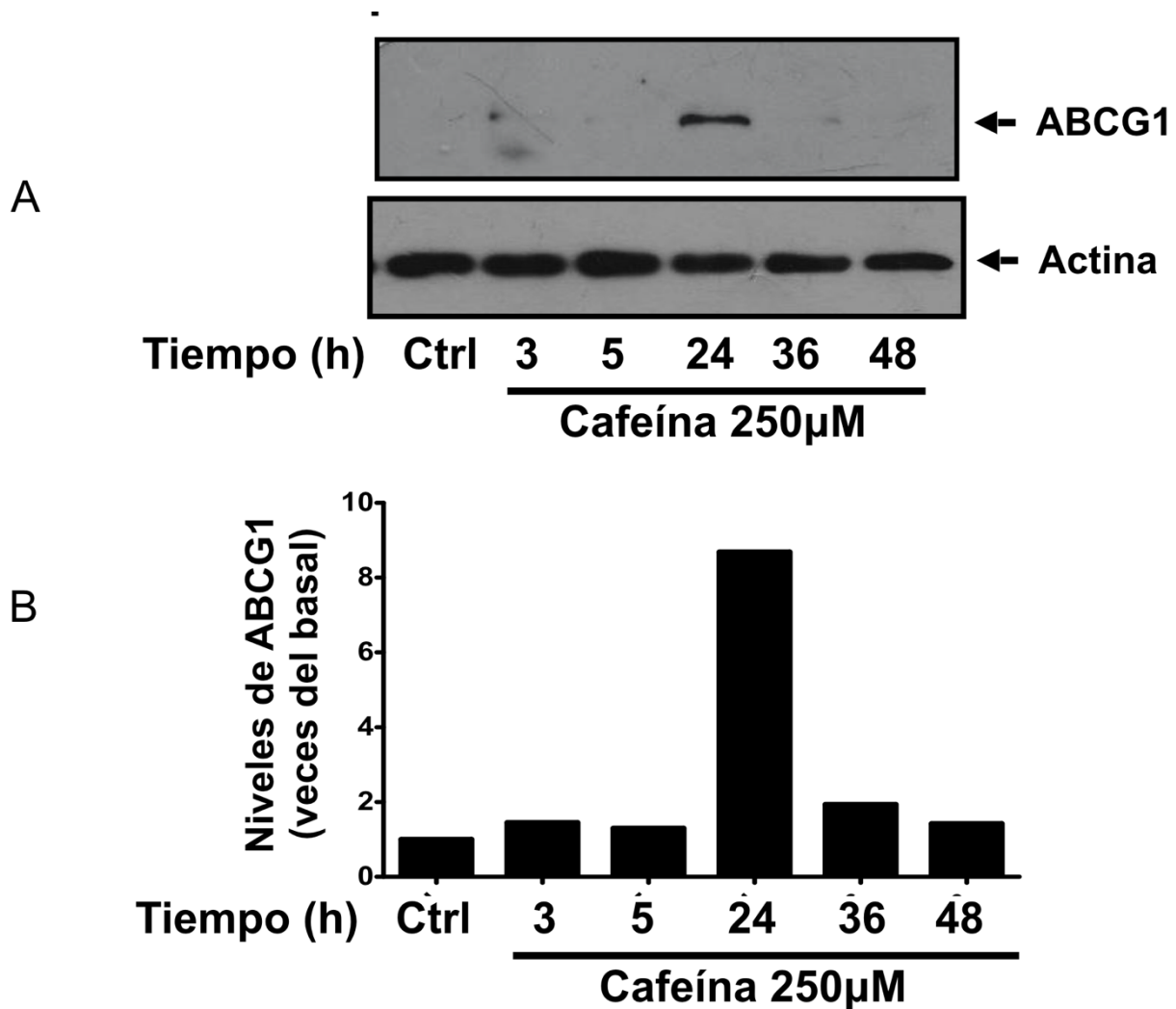


Figura 11. La cafeína promueve un incremento en la expresión de ABCG1 en células MDA-MB-231. Panel A. Células MDA-MB-231 cultivadas y estimuladas a diferentes tiempos en ausencia o presencia de cafeína. Los extractos celulares fueron analizados mediante la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos anti-BCG1 o anti-actina como control de carga. Panel B. La gráfica representa el valor de un experimento preliminar y es expresado como veces del basal con respecto al control.

XIV.4. La cafeína aumenta la expresión de CD36 en la línea celular MDA-MB-231.

CD36, también conocida como Glicoproteína plaquetaria 4, es una de las proteínas de membrana que interviene en el metabolismo de lípidos y recientemente se ha asociado a complicaciones metastásicas en diferentes tipos de cáncer. incluyendo al cáncer de mama (96). Adicionalmente, Stewart W y Nagarajan S, demostraron que CD36 puede llegar a desarrollar un papel importante en el proceso de adhesión celular en monocitos (73). Un estudio llevado a cabo por Kristine Lee en eritrocitos, demostró que la interacción entre CD36 e integrinas $\alpha 5\beta 1$ favorece la formación adhesiones celulares estables, a través de un mecanismo dependiente de Src y posterior activación de la vía de señalización p130CAS, la cual se asocia a la motilidad celular (74). La evaluación de la expresión de CD36 en células MDA-MB-231 expuestas a cafeína 250 μM durante 48 h de tratamiento. Finalmente, los extractos celulares fueron obtenidos y analizados mediante inmunodetección. En la Fig. 12A se puede observar que la expresión de CD36 es prácticamente imperceptible en la condición control, sin embargo, los cultivos que fueron expuestos a cafeína durante un lapso de 5 y 24 horas comenzaron a expresar la proteína de membrana CD36. La gráfica es el resultado del análisis de dos experimentos independientes, la cual sugiere que los cultivos que recibieron el estímulo de cafeína presentan un máximo de expresión proteica de CD36 a las 5 h de tratamiento en comparación con el grupo de células que no recibió el estímulo de cafeína.

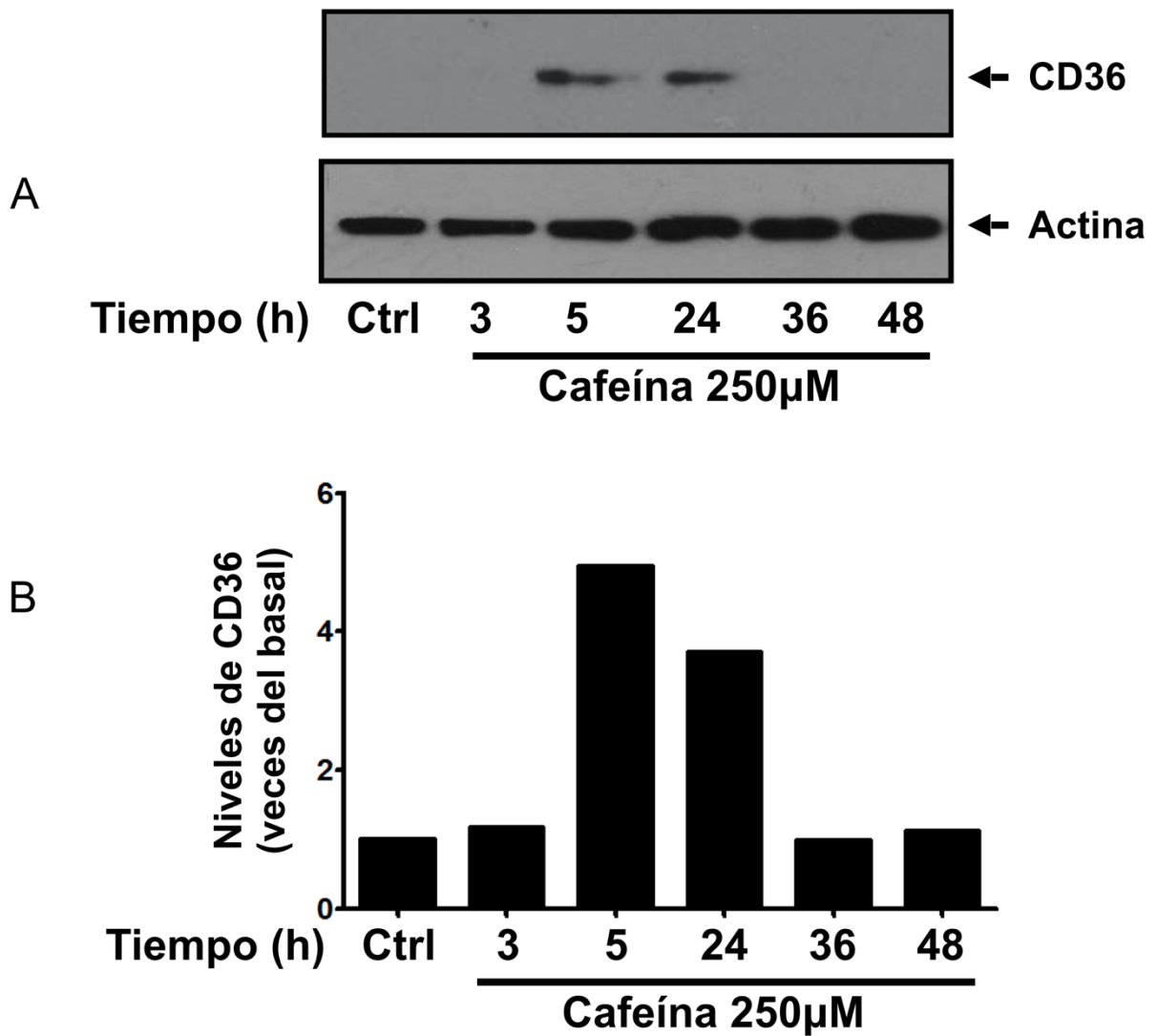


Figura 12. La cafeína aumenta la expresión de CD36 en la línea celular MDA-MB-231. Panel A. Células MDA-MB-231 cultivadas y estimuladas a diferentes tiempos en ausencia o presencia de cafeína. Los extractos celulares fueron analizados mediante la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-Actina o anticuerpo Anti-CD36. Panel B. La gráfica representa el valor de un experimento preliminar y es expresado como veces del basal con respecto al control.

XV. DISCUSIÓN

XV.1. La cafeína disminuye la capacidad de migrar e invadir de las células tumorales altamente invasivas MDA-MB-231.

Diversos estudios han demostrado la existencia de diferentes factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer mamario, entre estos se encuentran factores de riesgos reproductivos y hormonales, factores de riesgo genéticos y factores de riesgo asociados con el estilo de vida, principalmente la obesidad (7,10,12-15). Sin embargo, también existen factores protectores ante el desarrollo del cáncer de mama asociados al estilo de vida, por ejemplo, el consumo de brebajes como el té verde y el café (97,98,99). Estudios observacionales han demostrado que el consumo de café reduce hasta un 50% el riesgo de desarrollar dicha neoplasia (78). El grano de café está compuesto por diversos componentes, los que en mayor proporción se encuentran son el cafestol, kahweol y la cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (99). Esta última molécula ha sido utilizada para analizar su interacción con diversos tipos de cáncer (63, 101), incluyendo al cáncer mamario (102). Los diferentes tipos de tumores mamarios son clasificados dependiendo su tamaño, ubicación y si existe o no metástasis a ganglios linfáticos y/o órganos (103). Los tumores que tienen características triple negativo son conocidos por ser altamente agresivos, debido a que carecen de expresión de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2 (104,105). Los pacientes que desarrollan tumores metastásicos derivados de cáncer de mama triple negativo tienen una esperanza de vida relativamente corta, puesto que un estudio realizado en el 2018 demostró que el promedio de supervivencia en dichos afectados puede llegar a ser menor a los 15 meses posteriores al diagnóstico (106). Debido a esas razones, surge la necesidad de realizar la búsqueda de moléculas las cuales modulan la progresión tumoral mamaria con un fenotipo triple negativo.

Un estudio realizado por Rosendahl y su grupo de colaboradores, demostró la participación de la cafeína con el proceso de proliferación de células mamarias MDA-MB-231, las cuales presentan características de tumores triple negativo, mostrando una disminución de la en los niveles de proliferación al recibir estímulos de cafeína 0.2-5

Mm (78). Sin embargo, no existe evidencia del rol de la cafeína en el proceso migratorio de dicha línea tumoral. Nuestro grupo de trabajo demostró, por vez primera, que la cafeína induce una disminución de la migración en células mamarias MDA-MB-231 a concentraciones crecientes (1-5 mM).

Sin embargo, a pesar de nuestros resultados novedosos, las concentraciones utilizadas no son fisiológicamente alcanzables y pueden ser consideradas como tóxicas (107). En ese sentido, Shuying Dong y su grupo de colaboradores demostraron que bajas concentraciones de cafeína (<412 μ M), las cuales son fisiológicamente alcanzables, inhiben la progresión tumoral en hepatocarcinoma celular (62). Esto nos llevó a considerar que la cafeína a bajas concentraciones podría regular la migración celular de la línea tumoral mamaria MDA-MB-231. En resultados previos, demostramos que la cafeína (1-5 mM) induce una disminución de la capacidad migratoria de células con características de tumores triple negativo, por lo que decidimos utilizar concentraciones bajas. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que la cafeína presenta un efecto inhibitorio de la migración en células MDA-MB-231 a concentraciones fisiológicamente alcanzables (108).

FAK es una proteína con actividad tirosin cinasa no receptora, se encuentra involucrada en la progresión tumoral de diversos tipos de cáncer incluyendo el cáncer de mama, debido a que río abajo de las vías de señalización moduladas por dicha proteína se encuentran asociados los procesos de migración e invasión celular involucrados en la metástasis tumoral (109-111). Se ha demostrado que la cafeína disminuye la migración de células de glioma U87MG dependiente de la disminución del nivel de fosforilación de p-FAK (64). En este trabajo se demostró, por primera vez, que a partir de la primera hora de exposición a cafeína (250 μ M), disminuye el nivel de p-FAK^{Y397} hasta dos veces con respecto al nivel basal en células MDA-MB-231, fenómeno asociado a una disminución en su actividad catalítica.

La cinasa Src, al igual que FAK, es una proteína involucrada en la progresión tumoral, debido a la interacción entre estas dos quinasas, se desencadenan diversas vías de señalización relacionadas con la remodelación del citoesqueleto de actina y la motilidad celular (P130Cas/Rac), la proliferación (MAPK), la inhibición de la apoptosis y degradación de colágeno tipo IV (PI3K/Akt) (33-35), procesos que en conjunto y de

manera no regulada favorecen la metástasis celular en el cáncer de mamario. Existe evidencia previa de que la cafeína inhibe la actividad de Src al unirse con el receptor de adenosina A2A en células hepáticas (112). Nuestros resultados previos demostraron que cafeína disminuye los niveles de p-FAK^{Y397}, lo cual nos llevó a considerar el efecto probable de cafeína sobre p-Src^{Y418}. Acorde a nuestros resultados, demostramos que la cafeína (250 µM) disminuye el nivel de fosforilación de p-Src^{Y418} en la línea tumoral altamente invasiva MDA-MB-231 al transcurrir una hora de exposición, al comparar el resultado con las células que no recibieron el tratamiento con cafeína.

La MMP-2 y -9 están involucradas en la remodelación de la matriz extracelular (43), además de contar con la particularidad de degradar colágeno tipo IV (45) un componente estructural de la membrana basal. Sin embargo, en tumores invasivos estos procesos no se encuentran regulados, favoreciendo el proceso metastásico en diversos tipos de cáncer, incluyendo al cáncer de mama (49, 113, 114). De acuerdo con estos antecedentes, decidimos analizar los niveles de secreción de la MMP-2 y -9 en células MDA-MB-231 al ser estimuladas con cafeína (250 µM) mediante la técnica de zimografía. Nuestros resultados mostraron que el nivel de secreción de dichas MMPs no disminuye en células MDA-MB-231 al ser estimuladas con cafeína, por lo que posteriormente decidimos incrementar la concentración de cafeína (250-5000µM) para determinar si los niveles de secreción de la MMP-2 y -9 son dependientes de la dosis. Los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo sugieren que la cafeína disminuye la secreción de la MMP-2 y -9 a altas concentraciones (1000-5000 µM), sin embargo, dichas concentraciones no son fisiológicamente alcanzables ya que pueden producir toxicidad (107).

La metástasis involucra una serie de eventos, entre los que se incluyen los procesos de migración e invasión celular, en donde los tumores catalogados como metastásicos suelen ser altamente agresivos en los pacientes que los desarrollan, siendo la causa principal de muerte por cáncer (115). La línea celular MDA-MB-231 cuenta con las características de tumores triple negativos y, por tanto, la capacidad de desarrollar tumores altamente invasivos y de realizar metástasis (116). En este proyecto evaluamos el proceso de invasión mediante la técnica de Cámaras de Boyden recubiertas con matrigel sobre la línea celular MDA-MB-231, las cuales fueron tratadas

con cafeína. Nuestros resultados demuestran que las células MDA-MB-231 presentan una disminución en su capacidad invasiva al ser expuestas a cafeína (250 μ M), en comparación con el grupo de células que no recibieron el tratamiento.

En conclusión, nuestros resultados demuestran, por primera vez, que las células tumorales altamente invasivas MDA-MB-231 tratadas con cafeína presentan una disminución en la capacidad de migrar e invadir y, por tanto, la cafeína presenta la capacidad de suprimir la progresión tumoral *in vitro*.

XV.2. El papel de la cafeína en el metabolismo celular de la línea tumoral mamaria MDA-MB-231.

En la actualidad, la obesidad y el hipercolesterolemia es contemplada como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer mamario (117,118). Específicamente, se ha asociado a la alta concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) con el desarrollo tumoral en ratones con xenoinjertos de la línea celular altamente invasiva MDA-MB-231 (119). Particularmente, existe evidencia donde se ha demostrado la asociación entre la sobre expresión del LDLR con un mal pronóstico en el desarrollo del cáncer de mama (66). Esto nos llevo a considerar el efecto de la cafeína sobre la línea celular altamente invasiva MDA-MB-231, ya que, en nuestros resultados previamente obtenidos, demostramos que cafeína presenta efectos biológicos sobre los procesos de migración e invasión celular. Por lo que, en primera instancia evaluamos la expresión de LDLR en presencia y ausencia de cafeína. Nuestros resultados sugieren que la cafeína induce una disminución en la expresión del LDLR a partir de las 5 horas de tratamiento, mostrando una máxima disminución de la expresión a las 36 horas, en comparación con el grupo que no fue estimulado con cafeína. Estos resultados toman una gran relevancia, sugiriendo la asociación entre la exposición a cafeína y la reducción en la expresión del receptor de LDL concomitante a la disminución de los procesos de progresión tumoral.

En células prostáticas tumorales invasivas PC3 se ha determinado que la sobreexpresión de SREBP2 no necesariamente se asocia a un incremento en la expresión de LDLR (120). Desde otra perspectiva, la expresión de SREBP2 se ha

vinculado con favorecer la resistencia al tratamiento con cisplatino en cáncer de ovario, donde los genes dependientes de SREBP2 se incrementaron posteriores al tratamiento enriqueciendo el proceso metabólico del colesterol (121). Además, la sobreexpresión de SREBP2 en algunas líneas celulares mamarias se ha asociado con la lipogénesis y el proceso de proliferación (122). Por tal motivo, decidimos evaluar la expresión de dicha proteína en nuestro modelo celular. Nuestros resultados sugieren que en células MDA-MB-231 estimuladas con cafeína, SREBP2 incrementa su expresión hasta 4 veces del basal al compararlo con el grupo que no recibió tratamiento. Este resultado es considerado con bastante relevancia, ya que plantea una correlación inversa entre la expresión de SREBP2 y la expresión del receptor de LDL, indicando la posibilidad de que otras isoformas de SREBP pudieran encontrarse implicadas. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para describir este fenómeno.

Continuando con el análisis correspondiente al metabolismo del colesterol, diversos estudios han demostrado que ABCG1 tiene un papel directo sobre el transporte de colesterol al exterior de las células (123-125). Sag D y su grupo de trabajo, evidenciaron el rol que presenta la expresión de dicha proteína con el proceso de la homeostasis del colesterol y la inmunidad tumoral *in vivo* (126). Además, la evidencia publicada por Gabitova L y sus colegas, asocia a ABCG1 como probable regulador de procesos tumorales tanto en cultivos celulares como *in vivo* (127). Sin embargo, un estudio comparo la expresión genética y proteica de ABCG1 en tejido mamario con características triple negativo sin encontrar diferencias en comparación con tejido no tumoral (128). Con base en estas evidencias, realizamos el análisis de la expresión proteica de ABCG1 en la línea tumoral mamaria invasiva MDA-MB-231 en tratamiento con cafeína (250 μ M). Los resultados obtenidos por nuestro grupo sugieren que las células tumorales invasivas MDA-MB-231 estimuladas con cafeína sobreexpresan la proteína ABCG1, en comparación con el grupo de células que no recibió el tratamiento. Este resultado sugiere que las células tumorales tratadas con cafeína pudiesen presentar una modificación en el transporte de colesterol asociado a la expresión de ABCG1, sin embargo, debido a que este fenómeno es dependiente de múltiples mecanismos, es necesario evaluar si la cafeína modula la captura de colesterol en células MDA-MB-231.

CD36 es una glicoproteína encontrada en diversas líneas celulares, cumple con función de adhesión celular interactuando principalmente con colágeno (129). Además de estar asociada con el metabolismo de ácidos grasos desde la membrana plasmática (130), se ha asociado a favorecer procesos tumorales en diversos tipos de cáncer (68, 131), específicamente en cáncer de mama en donde células con ER-positivas por tamoxifeno han observado que la expresión de CD36 se ha asociado con atenuar el crecimiento celular (80). Nuestros resultados sugieren que células MDA-MB-231 con características de tumores triple negativo, sobreexpresan CD36, en comparación con el grupo que no recibió el tratamiento. Con base en nuestros resultados, proponemos que la cafeína pudiese encontrarse asociada con un posible incremento en la adhesión celular y su posible asociación con un efecto inhibitorio de la migración.

XVI. CONCLUSIONES

- En concentraciones fisiológicas de cafeína (en suero) se disminuyen los procesos de migración e invasión tumoral en la línea celular altamente invasiva MDA-MB-231.
- Los resultados sugieren que la cafeína a bajas concentraciones se encuentra involucrada en la homeostasis del metabolismo del colesterol en la línea celular MDA-MB-231.

XVI. BIBLIOGRAFÍA

- 1.-R K Hansen,M J Bissell. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer*. 2000 June ; 7(2): 95–113.
- 2.- Ole W. Petersen, Lone Rønnev-Jessen, Valerie M.et al. Differentiation and Cancer in the Mammary Gland: Shedding Light on an Old Dichotomy. *Adv Cancer Res*. 1998; 75: 135–161.
- 3.-Minghai Shao, MD et al. The curative effects of radiotherapy-based therapies for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer A meta-analysis. 96(38):e7946, SEP 2017
- 4.-Polyak K. Molecular Markers for the Diagnosis and Management of Ductal Carcinoma In Situ. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010(41):210-3.
- 5.- Jing Zhao et al. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells *Oncogene*. 2013 October ; 32(40): 4814–4824. doi:10.1038/onc.2012.494.
- 6.- Amye J. Tevaarwerk et al. Survival in Metastatic Recurrent Breast Cancer after Adjuvant Chemotherapy: Little Evidence for Improvement Over the Past Three Decades. *Cancer*. 2013 March 15; 119(6): 1140–1148.
- 7.- Sun H, Zou J, Chen L, Zu X, Wen G, Zhong J. Triple-negative breast cancer and its association with obesity. *Mol Clin Oncol*. 2017 Dec;7(6):935-942.
- 8.- Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;151:1-32.
- 9.- Kopp TI, Vogel U, Dragsted LO, Tjonneland A, Ravn-Haren G. Association between single nucleotide polymorphisms in the antioxidant genes CAT, GR and SOD1, erythrocyte enzyme activities, dietary and life style factors and breast cancer risk in a Danish, prospective cohort study. *Oncotarget*. 2017 May 22;8(38):62984-62997.
- 10.- Thakur P, Seam RK, Gupta MK, Gupta M, Sharma M, Fotedar V. Breast cancer risk factor evaluation in a Western Himalayan state: A case-control study and comparison with the Western World. *South Asian J Cancer*. 2017 Jul-Sep;6(3):106-109.
- 11.- Dung Yun Trieu P, Mello-Thoms C, Peat JK, Doan Do T, Brennan PC. Associations of Breast Density With Demographic, Reproductive, and Lifestyle Factors in a Developing Southeast Asian Population. *Asia Pac J Public Health*. 2017 Jul;29(5):377-387.
- 12.- Belinda Vicuña & Harold D. Delaney et al. Preferences for multigene panel testing for hereditary breast cancer risk among ethnically diverse BRCA-uninformative families. Received: 3 February 2017 / Accepted: 4 August 2017
- 13.- Marieke A Vollebergh et al. Genomic patterns resembling BRCA1- and BRCA2-mutated breast cancers predict benefit of intensified carboplatin-based chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2014 May 15;16(3):R47
- 14.- Lin CY, Carneal EE, et al. Regional Variability in Percentage of Breast Cancers Reported as Positive for HER2 in California: Implications of Patient Demographics on Laboratory Benchmarks. *Am J Clin Pathol*. 2017 Sep 1;148(3):199-207.
- 15.- OECD (2017), OECD Health Statistics 2017 (Forthcoming in June 2017). www.oecd.org/health/health-data.htm. <https://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf>
- 16.- Manuel Picon-Ruiz, et al. Obesity and Adverse Breast Cancer Risk and Outcome: Mechanistic Insights and Strategies for Intervention. *CA CANCER J CLIN* 2017;67:378–397
- 17.- Engin A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:571-606.
- 18.- Enrique Barrios , Mariela Garau. Cancer: magnitude of the problem in the worldCV A and in Uruguay, epidemiological aspects. *AnFaMed - ISSN: 2301-1254*.
- 19.- Jesús Cárdenas-Sánchez et al. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2015;14(Supl 2):2-55.

- 20.- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) (2014), “Estadísticas a propósito del Día mundial de la lucha contra el cáncer de mama 19 de octubre”, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México. [<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>: noviembre de 2015]
- 21.- Hoy Saludable (2011), “El cáncer de mama en México”, 10 de agosto, México. [<http://www.hoysaludable.com/el-cancer-de-mama-en-mexico>: 27 de noviembre de 2013].
- 22.- SS (Secretaría de Salud) (2002), “Programa de Acción: Cáncer de mama”, SS, México. [<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7105.pdf>: 15 de noviembre de 2015].
- 23.- María del Rocío Castrezana Campos. Geografía del cáncer de mama en México. Invest. Geog no.93 México ago. 2017.
- 24.- Castrezana Campos María del Rocío. Geografía del cáncer de mama en México. Invest. Geog [online]. 2017, n.93. ISSN 2448-7279.
- 25.- David L. Nelson, Michael M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry. 8-9:2012.
- 26.- Collins C, Nelson WJ. Running with neighbors: coordinating cell migration and cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Oct;36:62-70.
- 27.- Pablo F Peñas. Adhesion and mobility of human keratinocytes: β 1 integrins and tetraspanins. Servicio de Dermatología. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid. *Actas Dermosifiliogr* 2001;92:551-66 - Vol. 92 Núm.12
- 28.- Alberto Muñoz, cáncer, genes y nuevas terapias. Editorial Hélice. 88-98:1997.
- 29.- Almstedt K, Sicking I, Battista MJ, Huangfu S, Heimes AS, Weyer-Elberich V, Hasenburg A, Schmidt M. Prognostic Significance of Focal Adhesion Kinase in Node-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel).* 2017 Oct;12(5):329-333.
- 30.- Qi Shi and David Boettiger. A Novel Mode for Integrin-mediated Signaling: Tethering Is Required for Phosphorylation of FAK Y397. *Mol Biol Cell.* 2003 Oct; 14(10): 4306–4315.
- 31.- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* 1994 Mar;14(3):1680-8.
- 32.- MIHAIL B. CALALB, THOMAS R. POLTE, AND STEVEN K. HANKS, Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase at Sites in the Catalytic Domain Regulates Kinase Activity: a Role for Src Family Kinases. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Feb. 1995, p. 954–963.
- 33.- Zhang C. et al. Structural and functional insights into the interaction between the Cas family scaffolding protein p130Cas and the focal adhesion-associated protein paxillin. *J Biol Chem.* 2017 Nov 3;292(44):18281-18289.
- 34.- Liang W et al. Periodic mechanical stress stimulates the FAK mitogenic signal in rat chondrocytes through ERK1/2 activity. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(4):915-30.
- 35.- Deng Y, Wang F, Hughes T, Yu J. FOXOs in Cancer Immunity: Knowns and Unknowns. *Semin Cancer Biol.* 2018 Jan 5. pii: S1044-579X(17)30172-4.
- 36.- Sharma A, Mayer BJ. Phosphorylation of p130Cas initiates Rac activation and membrane ruffling. *BMC Cell Biol.* 2008 Sep 15;9:50.
- 37.- Minakshi Nihal, Gary S. Wood. c-CBL regulates melanoma proliferation, migration, invasion and the FAK-SRC-GRB2 nexus. *Oncotarget.* 2016 Aug 16; 7(33): 53869–53880.
- 38.- El Haibi CP, Sharma PK, Singh R, Johnson PR, Suttles J, Singh S, Lillard JW Jr. PI3Kp110-, Src-, FAK-dependent and DOCK2-independent migration and invasion of CXCL13-stimulated prostate cancer cells. *Mol Cancer.* 2010 Apr 22;9:85.
- 39.- Paul Toren, Amina Zoubeidi. Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer: Challenges and opportunities (Review). *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 45: 1793-1801, 2014 .
- 40.-Yao B et al. MAPK signaling pathways in eye wounds: Multifunction and cooperation. *Exp Cell Res.* 2017 Oct 1;359(1):10-16.

- 41.-Coomans de Brachène A, et al. The expression of the tumour suppressor HBP1 is down-regulated by growth factors via the PI3K/PKB/FOXO pathway. *Biochem J.* 2014 May 15;460(1):25-34.
- 42.-Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(12):2153-60.
- 43.- Silvia Coronato, Graciela Laguens, Vandal Di Girolamo. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina (Buenos Aires)* 2012; 72: 495-502.
- 44.- Muskan Kukreja et al. The high throughput multiplexed peptide-centric profiling illustrates both the substrate cleavage redundancy and specificity in the MMP family *Chem Biol.* 2015 August 20; 22(8): 1122–1133.
- 45.- Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 2006 Nov 17;127(4):679-95.
- 46.- Mohsen A, Collery P, Garnotel R, Brassart B, Etique N, Mohamed Sabry G, Elsherif Hassan R, Jeannesson P, Desmaële D, Morjani H. A new gallium complex inhibits tumor cell invasion and matrix metalloproteinase MMP-14 expression and activity. *Metallomics.* 2017 Aug 16;9(8):1176-1184.
- 47.- Yu-Jen Wu , Choo-Aun Neoh , Chia-Yu Tsao ,et al. Sinulariolide Suppresses Human Hepatocellular Carcinoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2/-9 through MAPKs and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16(7), 16469-16482;
- 48.- Mikala Egeblad & Zena Werb. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2, 161-174 (March 2002).
- 49.- Forget MA, Desrosiers RR, Béliveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999 Jul;77(7):465-80.
- 50.- Xiaoli Zhang, Guoyin Jin, Jianfeng Li, et al. Association between Four MMP-9 Polymorphisms and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit.* 2015; 21: 1115–1123.
- 51.- Iziar A. Ludwig, Michael N. Clifford, Michael E. J. Lean, et al. Coffee: biochemistry and potential impact on health. Published on 20 March 2014. Downloaded by Dalhousie University on 02/07/2014 09:01:44.
- 52.- Dybkowska E, Sadowska A, Rakowska R, et al. Assessing polyphenols content and antioxidant activity in coffee beans according to origin and the degree of roasting. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2017;68(4):347-353.
- 53.- Hermansen K, Krogholm KS, Bech BH, Dragsted LO, Hyldstrup L, Jørgensen K, Larsen ML, Tjønneland AM. [Coffee can protect against disease]. *Ugeskr Laeger.* 2012 Sep 24;174(39):2293-7.
- 54.- Baspinar B, Eskici G, Ozcelik AO. How coffee affects metabolic syndrome and its components. *Food Funct.* 2017 Jun 21;8(6):2089-2101.
- 55.- Poole R, Kennedy OJ, Roderick P, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ.* 2017 Nov 22;359:j5024.
- 56.- J. V. Higdon, B. Frei, Coffee and health: A review of recent human research, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2006, 46, 101–123.
- 57.- Navarro AM, Martinez-Gonzalez MA, Gea A, Ramallal R, et al. Coffee consumption and risk of hypertension in the SUN Project. *Clin Nutr.* 2017 Dec 21. pii: S0261-5614(17)31429-2.
- 58.- Gökçen BB, Şanlıer N. Coffee consumption and disease correlations. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Aug 30:1-13.
- 59.- MASAYUKI HAYASH et al. Caffeine-potentiated Chemotherapy for Metastatic Carcinoma and Lymphoma of Bone and Soft Tissue. *Anticancer Research* 25: 2399-2406 (2005). *J Cell Physiol.* 2010 Sep;224(3):775-85. doi: 10.1002/jcp.22180.
- 60.- Liu WH, Chang LS. Caffeine induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in human leukemia U937 cells via Ca²⁺/ROS-mediated suppression of ERK/c-fos pathway and activation of p38 MAPK/c-jun pathway.

- 61.- Dong S, Kong J, Kong J, Shen Q, Kong F, Sun W, Zheng L. Low Concentration of Caffeine Inhibits the Progression of the Hepatocellular Carcinoma via Akt Signaling Pathway. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(4):484-92.
- 62.- Liu H, Zhou Y, Tang L. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. *Mol Med Rep.* 2017 Sep;16(3):2445-2454.
- 63.- Chen Y, Chou WC, Ding YM, Wu YC. Caffeine inhibits migration in glioma cells through the ROCK-FAK pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(6):1888-98.
- 64.- Oh JK, Sandin S, Ström P, Lof M, Adami HO, Weiderpass E. Prospective study of breast cancer in relation to coffee, tea and caffeine in Sweden. *Int J Cancer.* 2015 Oct 15;137(8):1979-89.
- 65.- Demark-Wahnefried W, Platz EA, Ligibel JA, Blair CK, et al. The role of obesity in cancer survival and recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Aug (8):1244-59.
- 66.- Gallagher EJ, Zelenko Z, Neel BA, et al. Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia. *Oncogene.* 2017 Nov 36(46):6462-6471.
- 67.- Dong B, Singh AB, Kelvin Kan CF, et al. CETP inhibitors downregulate hepatic LDL receptor and PCSK9 expression in vitro and in vivo through a SREBP2 dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 2014 Aug; 235(2): 449–462.
- 68.- Jie Z, Xie Z, et al., SREBP-2 aggravates breast cancer associated osteolysis by promoting osteoclastogenesis and breast cancer metastasis, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019 Jan;1865(1):115-125
- 69.- Chen YH, Cimino PJ, Luo J, et al. ABCG1 maintains high-grade glioma survival in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 2016 Apr 26;7(17):23416-24.
- 70.- Bradley Smith, Hartmut Land. Anti-cancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene. *Cell Rep.* 2012 Sep 27; 2(3): 580–590.
- 71.- Wang J, Li Y. CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. *Theranostics.* 2019 Jul 9;9(17):4893-4908.
- 72.- Jing Zhao,1,2 Zheng Zhi,3 Chao Wang, et al. Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. *Oncol Rep.* 2017 Oct; 38(4): 2105–2115.
- 73.- Stewart BW, Nagarajan S. Recombinant CD36 inhibits oxLDL-induced ICAM-1-dependent monocyte adhesion. *Mol Immunol.* 2006 Feb;43(3):255-67.
- 74.- Davis SP, Lee K, Gillrie MR, et al. CD36 Recruits $\alpha 5\beta 1$ Integrin to Promote Cytoadherence of *P. falciparum*-Infected Erythrocytes. *PLoS Pathog.* 2013 Aug; 9(8): e1003590.
- 75.- Andrés Solidoro Santisteban. *Cancer in XXI century.* versión On-line ISSN 1728-5917.
- 76.- Corrao G et al. Coffee, caffeine, and the risk of liver cirrhosis. *Ann Epidemiol.* 2001 Oct;11(7):458-65.
- 77.- Wierzejska R. Coffee consumption vs. cancer risk - a review of scientific data. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2015;66(4):293-8.
- 78.- Heckman MA, Weil J, González de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci.* 2010 Apr;75(3):R77-87.
- 79.- Rosendahl AH, Perks CM, Zeng L, Markkula A, et al. Caffeine and Caffeic Acid Inhibit Growth and Modify Estrogen Receptor and Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 Apr 15;21(8):1877-87.
- 80.- Liang Y, Han H, Liu L, et al. CD36 plays a critical role in proliferation, migration and tamoxifen-inhibited growth of ER-positive breast cancer cells. *Oncogenesis.* 2018 Dec 21;7(12):98.
- 81.- McCusker RR, Goldberger BA, Cone EJ. Caffeine content of specialty coffees. *J Anal Toxicol.* 2003 Oct;27(7):520-2.
- 82.- Tai YL, Chen LC, Shen TL. Emerging roles of focal adhesion kinase in cancer. *Biomed Res Int.* 2015;2015:690690.

- 83.- Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer*. 2014 Sep;14(9):598-610.
- 84.- Deric L, Wheeler, Mari lida, Emily F, Dunn. The Role of Src in Solid Tumors. *Oncologist*. 2009 Jul; 14(7): 667–678.
- 85.- Han DC, Guan JL. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):24425-30.
- 86.- Holanda AO, Oliveira AR, Cruz KJ. Zinc and metalloproteinases 2 and 9: What is their relation with breast cancer?. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2017 Jan;63(1):78-84.
- 87.- Huang LL, Wang Z, Cao CJ, et al. AEG-1 associates with metastasis in papillary thyroid cancer through upregulation of MMP2/9. *Int J Oncol*. Sep;51(3):812-822.
- 88.- Abdollahi A, Nozarian Z, Nazar E. Association between Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-1, Matrix Metalloproteinase-2, and Matrix Metalloproteinase-9 Genes and Axillary Lymph Nodes Metastasis in Patients with Breast Cancer. *Int J Prev Med*. 2019 Jul 19;10:127.
- 89.- Qing Sun, Liang-liang Hu, Qiang Fu. MCT4 promotes cell proliferation and invasion of castration-resistant prostate cancer PC-3 cell line. *EXCLI J*. 2019; 18: 187–194.
- 90.- Wang Y, Xu C, Xu B, et al. Xiaojai Jiedu Recipe Inhibits Proliferation and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Blocking the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway. *Med Sci Monit*. 2019 Oct 7;25:7538-7546.
- 91.- Malvi P, Janostiak R, Nagarajan A, et al. Loss of thymidine kinase 1 inhibits lung cancer growth and metastatic attributes by reducing GDF15 expression. *PLoS Genet*. 2019 Oct 7;15(10):e1008439.
- 92.- Tsui KH, Wu MY, Lin LT, et al. Disruption of mitochondrial homeostasis with artemisinin unravels anti-angiogenesis effects via auto-paracrine mechanisms. *Theranostics*. 2019 Sep 17;9(22):6631-6645.
- 93.- Chen Q, Wang J, Zhang Q, et al. Tumour cell-derived debris and IgG synergistically promote metastasis of pancreatic cancer by inducing inflammation via tumour-associated macrophages. *Br J Cancer*. 2019 Oct 7.
- 94.- Amy E, Baek, Erik R, Nelson. The Contribution of Cholesterol and its Metabolites to the Pathophysiology of Breast Cancer. *Horm Cancer*. 2016 Aug; 7(4): 219–228.
- 95.- Edward B, Neufeld, Katherine O'Brien, Avram D, Walts, et al. Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCG1 Transporter. *Biology (Basel)*. 2014 Dec; 3(4): 781–800.
- 96.- Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 2017 Jan 5;541(7635):41-45.
- 97.- Suganuma M, Takahashi A, Watanabe T, et al. Biophysical Approach to Mechanisms of Cancer Prevention and Treatment with Green Tea Catechins. *Molecules*. 2016 Nov; 21(11): 1566.
- 98.- Lafranconi A, Micek A, Paol P, Bimonte S, et al. Coffee Intake Decreases Risk of Postmenopausal Breast Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis on Prospective Cohort Studies. *Nutrients*. 2018 Feb; 10(2): 112.
- 99.- Gotteland, Martín, & de Pablo V, Saturnino. (2007). ALGUNAS VERDADES SOBRE EL CAFÉ. *Revista chilena de nutrición*, 34(2), 105-115.
- 100.- Zhang Z, Xiao W, Luo W. Caffeine Suppresses Apoptosis of Bladder Cancer RT4 Cells in Response to Ionizing Radiation by Inhibiting Ataxia Telangiectasia Mutated-Chk2-p53 Axis. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Nov 5; 128(21): 2938–2945.
- 101.- Edling CE, Selvaggi F, Ghonaim R, et al. Caffeine and the analog CGS 15943 inhibit cancer cell growth by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cancer Biol Ther*. 2014 May 1; 15(5): 524–532
- 102.- Mysoon M, Al-Ansari, Abdelilah Aboussekhra. Caffeine Mediates Sustained Inactivation of Breast Cancer-Associated Myofibroblasts via Up-Regulation of Tumor Suppressor Genes. *PLoS One*. 2014; 9(3): e90907.

- 103.- Akram M, Iqba M, Daniya MI, et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017; 50: 33.
- 104.- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010 Nov 11;363(20):1938-48.
- 105.- Guha M, Srinivasan S, Raman P. et al. Aggressive triple negative breast cancers have unique molecular signature on the basis of mitochondrial genetic and functional defects. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018 Apr;1864(4 Pt A):1060-1071.
- 106.- Mohar-Betancourt A, Alvarado-Miranda A, Torres-Domínguez JA, et al. Prognostic factors in patients with breast cancer and brain metastasis as the first site of recurrence. *Salud Publica Mex.* 2018 Mar-Apr;60(2):141-150.
- 107.- Nomura M, Ichimatsu D, Moritani S, et al. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and Akt activation by caffeine. *Mol Carcinog.* 2005 Sep;44(1):67-76.
- 108.- Kathrin Fausch, Dominik E. Uehlinger, Stephan Jakob, et al. Haemodialysis in massive caffeine intoxication. *Clin Kidney J.* 2012 Apr; 5(2): 150–152.
- 109.- Lai H, Zhao Y, Qin Y, et al. Correction to: FAK-ERK activation in cell/matrix adhesion induced by the loss of apolipoprotein E stimulates the malignant progression of ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Oct 15;38(1):415.
- 110.- Nozaki M, Yasui H, Ohnishi Y. Ligand-Independent EGFR Activation by Anchorage-Stimulated Src Promotes Cancer Cell Proliferation and Cetuximab Resistance via ErbB3 Phosphorylation. *Cancers (Basel).* 2019 Oct 14;11(10). pii: E1552.
- 111.- Zeng Y, Cao Y, Liu L, et al. SEPT9_i1 regulates human breast cancer cell motility through cytoskeletal and RhoA/FAK signaling pathway regulation. *Cell Death Dis.* 2019 Sep 26;10(10):720.
- 112.- He Wang, Wenjie Guan, Wanzhi Yang, et al. Caffeine Inhibits the Activation of Hepatic Stellate Cells Induced by Acetaldehyde via Adenosine A2A Receptor Mediated by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK Signal Pathway. *PLoS One.* 2014; 9(3): e92482.
- 113.- Andrei Moroz, Flávia K. Delella, Rodrigo Almeida, et al. Finasteride Inhibits Human Prostate Cancer Cell Invasion through MMP2 and MMP9 Downregulation. *PLoS One.* 2013; 8(12): e84757.
- 114.- Dong-ming Wu, Shi-hua Deng, Teng Liu, et al. TGF- β -mediated exosomal Inc-MMP2-2 regulates migration and invasion of lung cancer cells to the vasculature by promoting MMP2 expression. *Cancer Med.* 2018 Oct; 7(10): 5118–5129.
- 115.- Robert J. [Biology of cancer metastasis]. *Bull Cancer.* 2013 Apr 1;100(4):333-42.
- 116.- Amaro A, Angelini G, Mirisola V, et al. A highly invasive subpopulation of MDA-MB-231 breast cancer cells shows accelerated growth, differential chemoresistance, features of apocrine tumors and reduced tumorigenicity in vivo. *Oncotarget.* 2016 Oct 18; 7(42): 68803–68820.
- 117.- Kyuwan Lee, Laura Kruper, Christina M. Dieli-Conwright, et al. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Curr Oncol Rep.* 2019; 21(5): 41.
- 118.- Kristine Pelton, Christine M. Coticchia, Adam S. Curatolo, et al. Hypercholesterolemia Induces Angiogenesis and Accelerates Growth of Breast Tumors in Vivo. *Am J Pathol.* 2014 Jul; 184(7): 2099–2110.
- 119.- Cedó L, Reddy ST, Mato E, et al. HDL and LDL: Potential New Players in Breast Cancer Development. *J Clin Med.* 2019 Jun; 8(6): 853.
- 120.- Chen Y, Hughes-Fulford M. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer.* 2001 Jan 1;91(1):41-5.
- 121.- Lei Zheng, Li Li, Yun Lu, et al. SREBP2 contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018 Apr; 243(7): 655–662.
- 122.- Stéphane J. H. Ricoult, Jessica L. Yecies, Issam Ben-Sahra, et al. Oncogenic PI3K and K-Ras stimulate de novo lipid synthesis through mTORC1 and SREBP. *Oncogene.* 2016 Mar 10; 35(10): 1250–1260.

- 123.- Vaughan AM, Oram JF. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30150-7.
- 124.- Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, et al. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jun;26(6):1310-6.
- 125.- Xie Q, Engel T, Schnoor M, et al. Cell surface localization of ABCG1 does not require LXR activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Nov;26(11):e143-4.
- 126.- Duygu Sag, Caglar Cekic, Runpei Wu, et al. The Cholesterol Transporter ABCG1 Links Cholesterol Homeostasis and Tumor Immunity. *Nat Commun*. 2015; 6: 6354.
- 127.- Linara Gabitova, Diana Restifo, Andrey Gorin, et al. Endogenous sterol metabolites regulate growth of EGFR/KRAS-dependent tumors via LXR. *Cell Rep*. 2015 Sep 22; 12(11): 1927–1938.
- 128.- Hailing Pan, Yue Zheng, Qi Pan, et al. Expression of LXR- β , ABCA1 and ABCG1 in human triple-negative breast cancer tissues. *Oncol Rep*. 2019 Nov; 42(5): 1869–1877.
- 129.- NCIB (National Center for Biotechnology Information), CD36 CD36 molecule [Homo sapiens (human)], Gene ID: 948, updated on 10-Oct-2019.
- 130.- Jan F. C. Glatz, Joost J. F. P. Luiken. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *J Lipid Res*. 2018 Jul; 59(7): 1084–1093.
- 131.- Zhao J, Zhi Z, Wang C, et al. Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. *Oncol Rep*. 2017 Oct;38(4):2105-2115.