



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“Expresión de los receptores AdipoR1 y AdipoR2 como mecanismo de  
regulación Leptina-Cáncer de mama”

**TESIS DE GRADO**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta

Q.F.B Martha Daniela Mociño Rodríguez

Dirigido por

Dra. María Dolores Hernández Navarro

Dr. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez

PhD. Miriam Verónica Flores Merino

Toluca Estado de México, Octubre 2017



El presente trabajo se presentó en el Segundo Congreso Nacional de Enfermedades Crónico Degenerativas y de Rezago con el Título: Efecto de Leptina sobre la Viabilidad en líneas de cáncer de mama.



**UAEM** | Universidad Autónoma del Estado de México

Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados  
Secretaría de Docencia  
Centro de Investigación en Ciencias Médicas  
Facultad de Química  
Cuerpos Académicos: Salud del Universitario,  
Investigación Educativa en Química e Investigación Biomédica

Otorga la presente

# Constancia

A: **Martha Daniela Mociño Rodríguez, María Dolores Hernández Navarro, Jonnathan Guadalupe Santillán Benitez, Miriam Verónica Flores Merino; David Salomón Dosal Dominguez.**

por su valiosa participación como ponente en la presentación oral:  
Efecto de Leptina sobre la Viabilidad en líneas de cáncer de mama.

en el **Segundo Congreso Nacional de Enfermedades Crónico Degenerativas y de Rezago**  
"Educación integral del profesionista del área de la salud"


Que se llevó a cabo, en la Facultad de Química los días 10 y 11 de Noviembre de 2016

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2016, Año del 50 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"  
"2016, Año de Leopoldo Flores Valdés"

Toluca, México, Noviembre de 2016

  
Centro de Investigación en Ciencias Médicas  
Dr. en E.P. J. Amado López Arriaga  
Coordinador

  
Dr. en Ing. Carlos Eduardo Barrera Díaz  
Director de la Facultad de Química



En el Segundo Congreso Nacional de Enfermedades Crónico Degenerativas y de Rezago se obtuvo el Primer Lugar en la presentación oral.



UAEM | Universidad Autónoma del Estado de México

Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados  
Secretaría de Docencia  
Centro de Investigación en Ciencias Médicas  
Facultad de Química  
Cuerpos Académicos: Salud del Universitario,  
Investigación Educativa en Química e Investigación Biomédica

Otorga la presente

# Constancia

A: Martha Daniela Mociño Rodríguez, María Dolores Hernández Navarro,  
Jonathan Guadalupe Santillán Benítez, Miriam Verónica Flores Merino,  
David Salomón Dozal Domínguez

por haber obtenido el primer lugar en la presentación oral:  
**Efecto de leptina sobre la viabilidad en líneas de cáncer de mama**  
en el **Segundo Congreso Nacional de Enfermedades Crónico Degenerativas y de Rezago**  
"Educación integral del profesionista del área de la salud"

Que se llevó a cabo, en la Facultad de Química los días 10 y 11 de Noviembre de 2016

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO  
"2016, Año del 50 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"  
"2016, Año de Leopoldo Flores Valdés"  
Toluca, México, Noviembre de 2016



Centro de Investigación en Ciencias Médicas  
Dr. en E.P. J. Amado López Arriaga  
Coordinador



Dr. en Ing. Carlos Eduardo Barrera Olaz  
Dirección de la Facultad de Química



Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados



Secretaría de Docencia



Así mismo, se envió un artículo de investigación a la Revista Disease Markers de la Editorial Hindawi.

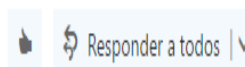
## 4862016: Acknowledging Receipt



Disease Markers <yara.khaled@hindawi.com>

Hoy, 10:21 a.m.

jonnathangsb@yahoo.com.mx; yara.khaled@hindawi.com; Mociño Rodríguez Martha Daniela; david\_dozal@hotmail.com; +4 destinatarios



Dear Dr. Santillán Benitez,

The Research Article titled "Expression of AdipoR1 and AdipoR2 receptors as a Leptin-Breast cancer regulation mechanism," by Mociño Rodríguez Martha Daniela, Jonnathan Guadalupe Santillán Benitez, Dozal Domínguez David Salomón, María Dolores Hernández-Navarro, Miriam Veronica Flores-Merino, Sandoval Cabrera Antonio and Francisco Javier Garcia Vázquez has been received and assigned the number 4862016.

The special issue for which the paper is being processed is  
"Advances in Breast Cancer Detection: Imaging, Serum and Tissue Markers, and Germline and Somatic Mutations"

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to Disease Markers.

Best regards,

--

\*\*\*\*\*

Yara Khaled  
Editorial Office  
Hindawi  
<http://www.hindawi.com>



## 4862016.v1 (Research Article)

|                   |   |
|-------------------|---|
| Title             | Expression of AdipoR1 and AdipoR2 receptors as a Leptin-Breast cancer regulation mechanism  |
| Journal           | Disease Markers   |
| Issue             | Advances in Breast Cancer Detection: Imaging, Serum and Tissue Markers, and Germline and Somatic Mutations (ABCD)   |
| Additional Files  | Cover Letter  |
| Manuscript Number | 4862016 (Research Article)  |
| Submitted On      | 2017-05-24  |
| Author(s)         | Mociño Rodríguez Martha Daniela,  Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez,  Dozal Domínguez David Salomón,   María Dolores Hernández-Navarro,   Miriam Veronica Flores-Merino,  Sandoval Cabrera Antonio,   Francisco Javier Garcia Vázquez |
| Editor            | Stefano M. M. Basso   |
| Status            | Under Review  |

Siendo aceptado el 20 de Julio del 2017 y publicado el 05 de Septiembre de 2017.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado por PRODEP con el proyecto DSA/103.5/16/10569.

Al Dr. David S. Dozal Domínguez y el Dr. Antonio Sandoval Cabrera por el apoyo brindado para la realización de la parte de cultivo celular y los ensayos de expresión génica en el Laboratorio de Alta Especialidad Hemato-oncológica del Hospital del niño, IMIEM. Muchas gracias por su apoyo, enseñanza y amistad.

Al Dr. Francisco Javier García por el apoyo recibido para la realización de los ensayos de Inmunohistoquímica. Muchas gracias por su apoyo y enseñanza.

A mis asesores de tesis la Dra. Lolita Hernández, el Dr. Jonnathan Santillán y la Dra. Miriam Flores, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación ha logrado que pueda terminar mis estudios con éxito.



## AGRADECIMIENTOS

A Dios,

por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi vida,  
por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme  
una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi esposo Alejandro,  
por su infinita paciencia, su tierna compañía y su inagotable apoyo  
en todo momento. Gracias por estar a mi lado en los momentos más  
complicados de este camino, por compartir mis sueños, mis logros y mi vida.  
Te amo inmensamente amor mío.

A mis padres Rosa Martha y Eduardo,  
quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar  
y educación siendo mi apoyo incondicional en todo momento.  
A ellos, que han depositado su entera confianza en cada reto que se  
me presenta sin dudar ni un solo momento en mí. Gracias por su preocupación  
y por estar a mi lado cuando las cosas no salían bien. Es por ustedes que soy lo que soy  
ahora. Los amo con toda mi vida.

A mis hermanos Eduardo y Alejandro,  
por ser parte importante de mi vida, por  
haberme apoyado en las buenas y en las malas,  
y sobre todo por su paciencia y amor incondicional.  
Los amo con toda mi vida.

## ÍNDICE

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>I.</b> RESUMEN                                       | 1             |
| <b>II.</b> ABSTRACT                                     | 2             |
| <b>III.</b> INTRODUCCIÓN                                | 3             |
| <b>IV.</b> MARCO TEÓRICO                                |               |
| <b>3.1</b> Glándula mamaria                             | 4             |
| <b>3.2</b> Cáncer de mama                               | 6             |
| <b>3.2.1</b> Factores de riesgo del Cáncer de Mama      | 7             |
| <b>3.2.2</b> Clasificación del Cáncer de Mama           | 8             |
| <b>3.2.3</b> Clasificación molecular del Cáncer de Mama | 12            |
| <b>3.3</b> Obesidad y su relación con el Cáncer de Mama | 15            |
| <b>3.4</b> Leptina                                      | 18            |
| <b>3.4.1</b> Receptores de Leptina                      | 20            |
| <b>3.5</b> Adiponectina                                 | 22            |
| <b>3.5.1</b> Receptores de Adiponectina                 | 24            |
| <b>3.6</b> Líneas Celulares de Cáncer de Mama           | 27            |
| <b>3.7</b> Antecedentes                                 | 30            |
| <b>3.8</b> Justificación                                | 34            |
| <b>3.9</b> Hipótesis                                    | 34            |
| <b>3.10</b> Objetivos                                   | 34            |
| <b>V.</b> PROCEDIMIENTO                                 |               |



|              |   |    |
|--------------|---|----|
| 4.1          | Cultivo Celular   | 36 |
| 4.2          | Conteo Celular  | 36 |
| 4.3          | Inmunohistoquímica  | 37 |
| 4.4          | Curvas de viabilidad celular  | 38 |
| 4.5          | Ensayo de Expresión   | 39 |
| 4.6          | Análisis Estadístico  | 43 |
| <b>VI.</b>   | <b>RESULTADOS</b>   |    |
| 5.1.5.1      | Publicación del Artículo en revista Disease Markers de la editorial Hindawi | 44 |
| 5.2          | Otros resultados y Discusión  | 70 |
| <b>VII.</b>  | <b>CONCLUSIONES</b>   | 75 |
| <b>VIII.</b> | <b>REFERENCIAS</b>  | 76 |

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Figura 1.</b> Anatomía de la Glándula mamaria.   | 5             |
| <b>Figura 2.</b> Clasificación molecular del cáncer de mama.  | 14            |
| <b>Figura 3.</b> Vías que pueden vincular la obesidad con el desarrollo del cáncer.   | 16            |
| <b>Figura 4.</b> Cambios en el tejido adiposo en la obesidad.   | 18            |
| <b>Figura 5.</b> Acción de la Leptina.  | 22            |
| <b>Figura 6.</b> Receptores AdipoR1 y AdipoR2.  | 25            |
| <b>Figura 7.</b> Acción de la Adiponectina.   | 26            |
| <b>Figura 8.</b> Cultivo celular de células de cáncer de mama MCF-7.  | 28            |
| <b>Figura 9.</b> Cultivo celular de células de cáncer de mama MDA-MB231.  | 29            |
| <b>Figura 10.</b> Cultivo celular de células de cáncer de mama HCC1937.   | 30            |
| <b>Figura 11.</b> Cámara de Neubauer, cuadrantes utilizados para el conteo celular.   | 37            |
| <b>Figura 12.</b> Placa de 96 pozos utilizada para determinar la viabilidad de células de cáncer de mama que recibieron un estímulo de Leptina.               | 39            |
| <b>Figura 13.</b> Placa de 24 pozos utilizada para determinar expresión de AdipoR1 y AdipoR2 en células de cáncer de mama que recibieron estímulo de Leptina. | 40            |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 14.</b> Secuencia Metodológica.   | 42 |
| <b>Figura 15.</b> Detección por Inmunohistoquímica de la proteína de Ki 67 (A), receptor de estrógenos (B), receptor de progesterona (C) y Her2 (D) en MDA-MB231.                         | 70 |
| <b>Figura 16.</b> Detección de expresión de mRNA del gen control ABL (1), Adiponectina (2) y Leptina (3) por medio de PCR en punto final en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231. | 71 |
| <b>Figura 17.</b> Detección de expresión de mRNA de ACTB (1), AdipoR1 (2) y AdipoR2 (3) por medio de PCR en punto final en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231                   | 72 |
| <b>Figura 18.</b> Porcentaje de crecimiento celular con estímulo de Leptina en células de cáncer de mama MDA-MB231.   | 73 |
| <b>Tabla 1.</b> Características moleculares de las Líneas celulares de cáncer de mama.  | 27 |
| <b>Tabla 2.</b> Secuencia se oligos utilizados en PCR punto final.  | 41 |

## I. RESUMEN

**Introducción:** Se ha documentado el papel que juega el tejido adiposo a través de Leptina y Adiponectina implicados en el desarrollo y progreso del cáncer de mama, pero muy pocos son los estudios sobre AdipoR1 y AdipoR2 y la influencia de la Leptina sobre ellos.

**Objetivo:** Analizar la expresión de AdipoR1 y AdipoR2 modulada por concentraciones diferenciales de Leptina en un modelo de obesidad asociado a cáncer de mama en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB231 y HCC1937.

**Métodos:** Se analizó la expresión de AdipoR1 y AdipoR2 por PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan®, mediado por concentraciones de Leptina (0 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL y 1000 ng/mL) en líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7, MDA-MB231 y HCC1937. Se caracterizó cada línea celular por Inmunohistoquímica.

**Resultados:** La Leptina generó un aumento de la población celular en MCF-7 (23.8%, 10 ng/mL, 48 h); en MDA-MB231 la población aumentó hasta un 17.02% (1000 ng/mL, 72 h) y en HCC1937 aumentó en un 17.24% (1000 ng/mL, 72h). En MCF-7 la expresión de AdipoR1 disminuyó (3.81%, 1000 ng/mL), excepto para 100 ng/mL (64.03%). La expresión de AdipoR2 aumentó hasta 13.74 veces (10 ng/mL) respecto al control. En HCC1937 la expresión de AdipoR1 disminuyó hasta un 86.28% (10 ng/mL), mientras que la expresión de AdipoR2 tuvo una disminución hasta un 50.3% (100 ng/mL).

**Conclusiones:** La concentración de normo-peso (10 ng/mL) de Leptina generó un aumento de la expresión de ambos receptores de Adiponectina.

**Palabras Clave:** Cáncer de mama, MCF-7, MDA-MB231, HCC1937, Leptina, AdipoR1, AdipoR2.

## II. ABSTRACT

**Introduction:** The development of breast cancer is influenced by the adipose tissue through the proteins leptin and adiponectin. However, there is little research concerning AdipoR1 and AdipoR2 receptors and the influence of leptin over them.

**Objective:** The objective of this work was to analyze the expression of AdipoR1 and AdipoR2, modulated by differential concentrations of leptin in an obesity model (10 ng/mL, 100 ng/mL, and 1000 ng/mL) associated with breast cancer in MCF-7, MDA-MB231 and HCC1937 cell lines.

**Methods:** The expression of AdipoR1 and AdipoR2 was analyzed by real-time PCR using TaqMan® probes, mediated by concentrations of Leptin (0 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL and 1000 ng/mL) in cell lines of breast cancer: MCF-7, MDA-MB231 and HCC1937. Each cell line was characterized by Immunohistochemistry.

**Results:** Leptin generated an increase in the cell population in MCF-7 (23.8%, 10 ng/mL, 48 h); in MDA-MB231 the population increased 17.02% (1000 ng/mL, 72 h) and in HCC1937 increased 17.24% (1000 ng/mL, 72 h). In MCF-7 the expression of AdipoR1 decreased (3.81%, 1000 ng/mL), except for 100 ng/mL (64.03%). Expression of AdipoR2 increased by 13.74 times (10 ng/mL) with regard to the control. In HCC1937, the expression of AdipoR1 decreased by 86.28% (10 ng/mL), as well as the expression of AdipoR2 (50.3%, 100 ng/mL).

**Conclusions:** The concentration of normal weight (10 ng/mL) of Leptin generated an increase in the expression of both Adiponectin receptors.

**Keywords:** Breast cancer, MCF-7, MDA-MB231, HCC1937, Leptin, AdipoR1, AdipoR2.

### III. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 20 años se ha vinculado el desarrollo de cáncer de mama a los cambios en el estilo de vida, principalmente a la obesidad [1]. La obesidad, es un exceso en la acumulación de tejido adiposo producida cuando la ingesta calórica supera el gasto de energía [2]. El tejido adiposo participa a través de diversos factores en el desarrollo del cáncer debido a que actúa también como un órgano endócrino, liberando Leptina, Adiponectina y moléculas pro-inflamatorias [3].

La alteración de la secreción de estas adipocitocinas en obesidad incrementando la liberación de Leptina, VEGF, IL-6 y TNF- $\alpha$  y disminuyendo la secreción de Adiponectina, podría estar ligada a diferentes mecanismos carcinogénicos incluyendo diferenciación celular, apoptosis, proliferación celular, angiogénesis y alteración de los niveles de hormonas sexuales esteroideas [4].

Las patologías que modifican la biología del tejido adiposo, como la obesidad, alteran fuertemente la producción de adipocitocinas, lo que podría explicar la relación entre la obesidad y el desarrollo del cáncer de mama [5,6].

En este trabajo de investigación se analizó la expresión génica de AdipoR1 y AdipoR2 modulada por diferentes concentraciones de Leptina (0 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL y 1000 ng/mL) en un modelo de obesidad asociado a cáncer de mama en líneas celulares (MCF-7, MDA-MB231 y HCC1937). Esto con el objetivo de determinar si uno de los mecanismos por los cuales la acción anti-proliferativa de la Adiponectina se ve disminuida en un estado de sobrepeso-obesidad es debido a la disminución de la expresión de AdipoR1 y AdipoR2 causada por el exceso de Leptina.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula sudorípara modificada localizada en el tejido subcutáneo que tiene como principal función secretar leche durante el periodo de la lactancia, asegurando la alimentación del recién nacido. Estas glándulas exocrinas son glándulas sudoríparas dilatadas [7]. Se encuentran situadas en la parte anterosuperior del pecho, a derecha e izquierda del esternón, delante de los músculos pectorales mayor y menor, en el intervalo comprendido entre la tercera y la séptima costillas, ubicadas simétricamente a la altura de los brazos [8].

- **Estructura de la glándula mamaria**

La glándula mamaria está constituida por las estructuras internas, lobulillos y acinos glandulares, y por estructuras externas, areola y pezón [9].

- **Estructuras internas**

La glándula mamaria está constituida de 15 a 20 lobulillos glandulares, cada uno de los cuales tienen dependencia funcional. Cada lóbulo de la glándula mamaria está formado por la unión de numerosos lobulillos donde se encuentran los acinos glandulares o alveolos y las células productoras de leche. Cada lobulillo posee un conducto excretor: conducto galactóforo o lácteo, los cuales son dilataciones ductales a modo de reservorios situados inmediatamente por detrás del pezón, formados por un epitelio escamoso no queratinizado [9].

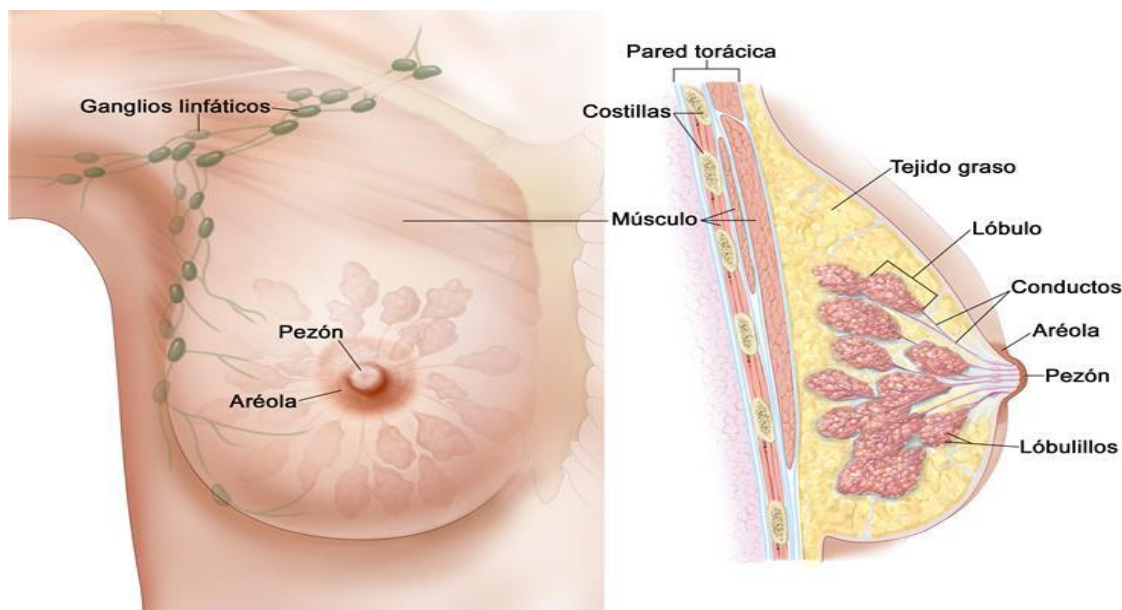


- **Estructuras externas**

La mayor parte de la mama está cubierta por una piel fina móvil que continúa en la periferia con la piel del tórax. Su vértice está constituido por una zona redondeada y pigmentada, llamada aréola, en el centro de la cual se encuentra el pezón [9].

La areola mamaria es una zona cutánea circular de 15 a 25 mm de diámetro. Su superficie está formada por pequeñas elevaciones denominadas glándulas areolares o glándulas de Morgagni. El pezón se encuentra en el centro de la areola, es cilíndrico y mide de 10 a 12 mm. En la base del conjunto areola-pezón se localizan las células mioepiteliales, las cuales están rodeadas por fibras musculares lisas en forma radial que provocan la erección del pezón ante estímulos externos tales como succión, roce, tacto y frío, produciendo la salida de la leche almacenada en los galactóforos [9].

Así mismo, la glándula mamaria también está constituida por tejido subcutáneo, una capa adiposa retromamaria, venas y ganglios linfáticos. En la Figura 1 se puede observar todas las estructuras tanto internas como externas que conforman a la glándula mamaria.



**Figura 1.** Anatomía de la Glándula mamaria

Fuente: Instituto Nacional del Cáncer, 2016

### 3.2 Cáncer de mama

Las mamas, al igual que todos los órganos que forman nuestro cuerpo están constituidos por células, que normalmente se dividen de forma ordenada con el fin de reemplazar a las envejecidas o muertas.

Cada célula posee una serie de mecanismos de control que regulan este proceso, cuando en una célula se alteran se inicia una división incontrolada produciendo un tumor o nódulo con la capacidad de producir metástasis [11]. Por lo anterior, el cáncer de mama es definido como el crecimiento anormal y descontrolado de células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios, que son capaces de infiltrar tejidos y órganos cercanos destruyéndolos, trasladándose y proliferando en otras partes del organismo generando metástasis [12]. Inicia como una proliferación acelerada y desregulada de células en la región ducto-lobular terminal, llevando a la formación de cúmulos celulares que después de un tiempo forman el tumor [13].

El cambio de una célula normal a una cancerígena precisa de múltiples alteraciones y mutaciones en los genes encargados de regular los mecanismos de control del ciclo y crecimiento celular. Desde que comienzan las modificaciones en las células hasta que el tumor se hace palpable, se requiere que transcurran muchos años. En la mama también pueden aparecer tumores benignos constituidos por células que se dividen en exceso pero no pueden dañar o invadir otras partes del organismo [14].

El desarrollo de un proceso neoplásico se presenta como una enfermedad heterogénea, ya que comprende múltiples entidades patológicas asociadas a una variedad de patrones histológicos y biológicos distintivos [13]. Puede originarse a partir de cualquier estirpe celular que compone al tejido mamario. Sin embargo, los tumores más frecuentes son carcinomas, un tipo de cáncer que se origina en las células epiteliales que revisten las estructuras ductales y lobulares terminales indiferenciadas [15,16].

En México, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres, representando el 13.4% de todos los casos de cáncer. A partir de 2006 ocupa el primer lugar como causa de muerte por neoplasia maligna en las mujeres de 25 años en adelante y ha desplazado de esta posición al cáncer cérvicouterino [11]. Para el 2012 se estimó que el número de casos de cáncer de mama en México fue de 20,444, mientras que el número de defunciones fue de 5,595 [17]. En países tanto desarrollados como en países en desarrollo es el tipo de cáncer más común [18].

### **3.2.1 Factores de Riesgo del Cáncer de Mama.**

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial, se han identificado algunos factores que aumentan el riesgo de que se produzca el cáncer. Los considerados más importantes son:

- Edad; Aunque el cáncer de mama puede afectar a cualquier edad, el riesgo de padecerlo aumenta con la edad y la mayor incidencia se concentra entre los 50 y los 65 años de la mujer.
- Factores hormonales; como la primera regla a edad temprana y la menopausia tardía. La ausencia de embarazo o tener el primer embarazo a una edad avanzada (después de los 30 años) son también factores de riesgo bien conocidos.
- Antecedentes familiares de cáncer de mama; las mujeres con antecedentes familiares directos tales como madre, hermana o hija, de cáncer de mama tienen un riesgo aumentado de padecer la enfermedad respecto a las que no poseen dichos antecedentes.
- Mutaciones en genes reparadores; se podría tratar de un cáncer de mama hereditario. En este tipo de cáncer se producen alteraciones genéticas, cada vez mejor conocidas, como los genes BRCA1 y BRCA2, que se heredan.
- La obesidad o el sobrepeso; relacionado con las adipocitocinas secretadas por el tejido adiposo y que regulan el metabolismo.

- Tratamiento con radioterapia sobre la mama en la infancia o adolescencia; es decir mama en desarrollo, por otro tumor como un linfoma.
- Algunas enfermedades benignas de la mama de tipo proliferativo; como el aumento en el número de células con alteraciones celulares.
- El consumo de alcohol y tabaco; favorece la aparición de muchos tumores malignos [14,19].

### 3.2.2 Clasificación del cáncer de mama.

La asignación del tipo histológico se basa en el tipo de células que componen el tumor. Este puede ser *in situ*, es decir la población de células neoplásicas limitada a los conductos y lobulillos por la membrana basal, o invasor cuando las células neoplásicas han invadido más allá de la membrana basal [20-22]. Otros tipos de cáncer menos comunes son el inflamatorio, tubular, medular, mucinoso y papilar, entre otros [23].

Con relación al carcinoma invasor y al carcinoma *in situ*, es el primero el que tiene una mayor incidencia, con un 70-80% contra 15-30% del segundo. El índice de prevalencia de cáncer de mama en el Estado de México fue de 7.63 por cada 100 mil mujeres en el año 2007, mientras que en todo México para el año 2008 se presentaron 13,700 casos nuevos de esta neoplasia [24].

Los carcinomas no invasores o *in situ* pueden iniciar tanto en los conductos como en los lobulillos mamarios:

- **Carcinoma ductal *in situ*:** El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) es una neoplasia heterogénea caracterizada por la presencia de células epiteliales malignas que crecen dentro de los conductos mamarios, sin rebasar la membrana basal. Adopta diferentes patrones de crecimiento dentro del conducto lácteo y presenta

características citológicas y de necrosis variable, generalmente es unifocal. Se conoce también con el nombre de carcinoma intraductal [23,25].

- **Carcinoma lobulillar *in situ*:** El carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) se origina del lobulillo terminal ductal, pudiéndose distribuir de forma difusa por la mama. Es una lesión poco frecuente y su diagnóstico histológico y diferencial con hiperplasia atípica requiere la intervención de patólogos expertos. Esta lesión se considera como un marcador de riesgo, debido a que las mujeres con CLIS tienen un riesgo de hasta el 30% de desarrollar cáncer de mama invasor, más frecuentemente ductal infiltrante, presentándose con la misma frecuencia en ambas mama. El riesgo de aparición de cáncer de mama invasor es de aproximadamente 0.5% por año de seguimiento y cuando se vincula con carga genética de primer grado aumenta a 1% por año [23,25].

Por otro lado, aproximadamente 75-80% de los cánceres son invasivos o infiltrantes. Esta característica le da a las células la capacidad de penetrar alrededor de los canales linfáticos y vasculares dando metástasis. El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasor que representa el 70 al 80%, el segundo más común es el lobulillar invasor con el 5-10%, difícil de diagnosticar por su diseminación difusa en vez de formar una masa, su tasa de multifocalidad y bilateralidad es alta [23].

Para llevar a cabo la clasificación del tumor mamario en estudio se utiliza la estadificación TNM, la cual ayuda a evaluar los riesgos y el pronóstico asociado a las características específicas de la paciente y el tipo de cáncer implicado. Este sistema se utiliza de forma generalizada e implica tres aspectos fundamentales: 1) combinación del tamaño del tumor (T) y la invasión del tejido circundante, 2) la implicación de los ganglios linfáticos (N); y 3) metástasis (M) o la extensión del cáncer a otro órgano del cuerpo, para clasificar el tumor en uno de los cinco estadios. El estadio es fundamental para decidir el tratamiento. Cuanto menos avanzado es el estadio, mejor es el pronóstico [19, 25, 26].

Un tumor mamario se puede clasificar dentro de los siguientes estadios:

- **Estadio 0:** Se utiliza para describir los casos de cáncer de mama no invasivos, como el CDIS. Las células anómalas continúan contenidas en el conducto en el que aparecieron en un principio.
- **Estadio I:** Es el cáncer de mama invasivo donde el tumor mide menos de 2 cm y pueden encontrarse pequeños grupos de células cancerosas en los ganglios linfáticos. El cáncer de mama de estadio I se divide en los estadios IA y IB.
  - **Estadio IA:** describe el cáncer de mama invasivo donde el tumor mide hasta 2 cm y el cáncer no se ha extendido más allá de la mama, no hay ganglios linfáticos afectados.
  - **Estadio IB:** describe el cáncer de mama invasivo en el que 1) no hay tumor en la mama; en cambio, se observan en los ganglios linfáticos pequeños grupos de células cancerígenas ( $\geq 0,2$  mm y  $\leq 2$  mm), o 2) se observa un tumor en la mama inferior a 2 cm y pequeños grupos de células cancerígenas ( $\geq 0,2$  mm y  $\leq 2$  mm) en los ganglios linfáticos.
- **Estadio II:** El tumor mide menos de 2 cm y se ha extendido a los ganglios linfáticos en la axila, o el tumor mide entre 2 cm y 5 cm de diámetro pero no se ha extendido a los ganglios linfáticos en la axila. El cáncer de mama de estadio II se divide en los estadios IIA y IIB.
  - **Estadio IIA:** describe el cáncer de mama invasivo en el que 1) no hay ningún tumor en la mama, pero se detectan células cancerígenas ( $\geq 2$  mm) en 1-3 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cerca del esternón; o 2) el tumor mide 2 cm o menos, y se ha propagado hacia los ganglios linfáticos axilares; o 3) el tumor mide entre 2 y 5 cm, y no se ha propagado hacia los ganglios linfáticos axilares.
  - **El estadio IIB:** describe el cáncer de mama invasivo en el que 1) el tumor mide entre 2 y 5 cm, y se observan en los ganglios linfáticos pequeños grupos de células cancerígenas ( $\geq 0,2$  mm y  $\leq 2$  mm); o 2) el tumor mide entre 2 y 5 cm, y el cáncer se ha propagado en 1-3 ganglios linfáticos

axilares o en los ganglios linfáticos cercanos al esternón; o 3) el tumor mide más de 5 cm, pero no se ha propagado hacia los ganglios linfáticos axilares.

- **Estadio III:** Es el cáncer de mama invasivo en el que el tumor puede tener cualquier tamaño y se divide en las subcategorías IIIA, IIIB y IIIC.
  - **Estadio IIIA:** describe el cáncer de mama invasivo en el que 1) no hay tumor en la mama o el tumor puede tener cualquier tamaño y se detectó la presencia de cáncer en 4-9 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cercanos al esternón; o 2) el tumor mide más de 5 cm, y se observan en los ganglios linfáticos pequeños grupos de células cancerígenas ( $\geq 0,2$  mm y  $\leq 2$  mm); o 3) el tumor mide más de 5 cm, y el cáncer se ha propagado en 1-3 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
  - **Estadio IIIB:** describe el cáncer de mama invasivo en el que 1) el tumor tiene un tamaño indefinido y se ha propagado hacia la pared torácica o la piel de la mama provocando inflamación o una úlcera; o 2) pudo haberse propagado hacia más de 9 ganglios linfáticos axilares; o 3) pudo haberse propagado hacia los ganglios linfáticos cercanos al esternón. El cáncer de mama inflamatorio pertenece a este estadio.
  - **Estadio IIIC:** describe el cáncer de mama invasivo en el que puede que no haya indicios de la enfermedad en la mama o si hay un tumor, puede tener cualquier tamaño y haberse propagado hacia 1) 10 o más ganglios linfáticos axilares; o 2) ganglios linfáticos ubicados sobre o debajo de la clavícula; o 3) ganglios linfáticos axilares o los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
- **Estadio IV:** Es el cáncer de mama invasivo que se ha propagado más allá de la mama y los ganglios linfáticos circundantes hacia otros órganos del cuerpo, como los pulmones, ganglios linfáticos distantes, la piel, los huesos, el hígado y el cerebro [19, 27].



Así mismo se asigna un grado al tumor en estudio. El grado se basa en la heterogeneidad de las células tumorales, la estructura arquitectónica del tejido que forman y la frecuencia de mitosis (división celular), reflejando su agresividad [13, 25].

- **G1:** Bien diferenciado. Las células presentan un núcleo pequeño, uniforme, cromatina densa. Se observan menos de 10 mitosis en 10 campos consecutivos a gran aumento en el área de mayor actividad mitótica. El 75% o más del tumor compuesto por túbulos.
- **G2:** Moderadamente diferenciado. Las células presentan un núcleo con moderada variación en tamaño y forma, puede observarse nucléolo poco aparente. Se observan de 10 a 20 mitosis en 10 campos consecutivos a gran aumento en el área de mayor actividad mitótica. El 10% a 75% del tumor compuesto por túbulos.
- **G3** Mal diferenciado. Las células presentan un núcleo con marcado incremento en tamaño, forma y contornos irregulares, dos o más nucléolos prominentes, cromatina gruesa. Se observan más de 20 mitosis en 10 campos de gran aumento. Menos de 10% del tumor compuesto por túbulos [25].

Un tumor bien diferenciado (G1) presenta poca heterogeneidad de células, conserva su estructura arquitectónica y tiene pocas mitosis (menos de 10). Un tumor poco diferenciado (G3) presenta una heterogeneidad elevada, pérdida de su arquitectura y muchas mitosis. Cuanto más bajo sea el grado mejor es el pronóstico [13,19].

### **3.2.3 Clasificación molecular del cáncer de mama**

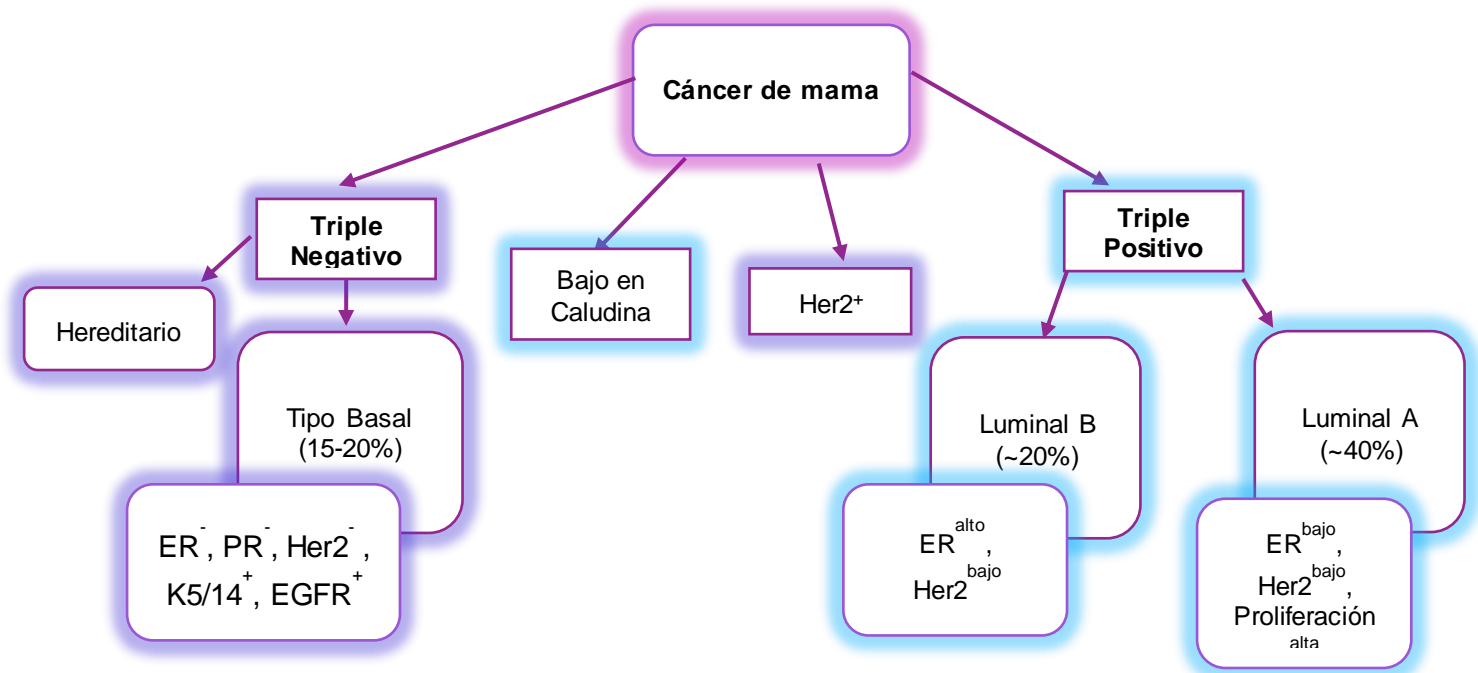
Por otro lado, la investigación biomédica básica que se ha realizado en cáncer de mama ha demostrado que los tumores mamarios expresan genes distintos que les confieren a cada tumor un fenotipo específico [28-30]. Perou *et al.*, (2000) propuso por primera vez una clasificación molecular del cáncer de mama basada en perfiles de expresión génica, identificando al menos cuatro subgrupos de cáncer de mama tal como se puede observar en la Figura 2 [31-34].

Actualmente se han identificado los siguientes subtipos moleculares que van de la mano con la clasificación histológica [35]:

- **Triple Positivo:** se deriva de su similitud con el perfil de expresión del epitelio luminal normal y que son positivos para los receptores hormonales Estrógenos (RE), Progesterona (RP) y Her2 [36].
  - **Luminal A:** Los tumores de esta clasificación tienen sobreexpresión de genes regulados por RE, subexpresión de un grupo de genes Her2 y subexpresión de genes relacionados con la proliferación. Son sensibles a la manipulación endocrina, poco sensibles a agentes citotóxicos y tienen asociado un pronóstico bastante favorable [37-39].
  - **Luminal B:** Tienen una expresión mucho menor de genes relacionados con ER, una expresión variable de un grupo de genes Her2, y una expresión relativamente más alta de genes relacionados con la proliferación. Presentan inestabilidad genómica, albergan mutaciones en TP53 y se asocian con un riesgo relativamente mayor de recaída [40-42].
- **Her2:** Representa del 20% al 30% de todos los tumores de mama. Se caracterizan por una sobreexpresión de genes de proliferación de Her2 y una baja expresión de grupos luminales. Generalmente son Her2 positivos y RE/RP-negativo, asociándose con un peor pronóstico en comparación con los tumores luminal A [31, 43].
- **Triple Negativo:** Estos tumores representan un grupo de enfermedades más heterogéneo que los cánceres de mama basales. Se caracteriza por una frecuencia relativamente alta de mutaciones del gen BRCA1, aumento de la inestabilidad genómica, alta expresión del grupo de proliferación de genes y un alto grado histológico [45, 46].
  - **Tipo Basal:** Su nombre se deriva de patrones de expresión de genes compartidos con células basales epiteliales normales (queratina 5,6 y 17, integrina- $\beta$ 4, laminina y proteína de unión al ácido graso) y representa

aproximadamente el 15% de los cánceres de mama ductal invasivos. Estos tumores son usualmente negativos para RE, RP y Her2 [31, 44].

- **Cáncer de mama Hereditario:** Se caracteriza por mutaciones en genes supresores de tumor y protooncogenes.
  
- **Tipo bajo en Claudina:** Se caracteriza por la sobreexpresión de genes asociados con la transición epitelial a mesenquimal (genes de comunicación celular, de formación de la matriz extracelular, de diferenciación celular, de migración celular y de angiogénesis). No tienen expresión de marcadores de diferenciación luminal y son Her2 y receptores hormonales negativos [47].



**Figura 2:** Clasificación molecular del cáncer de mama.

Fuente: Modificado de Malhotra *et al.*, 2010

La identificación de estos subgrupos moleculares proporciona información importante sobre el pronóstico y la respuesta al tratamiento de la enfermedad [48-50].

DURANTE los últimos 20 años se ha vinculado al desarrollo de cáncer de mama a los cambios en el estilo de vida de las mujeres, como la edad más tardía al primer embarazo, disminución de la duración de la lactancia, estilo de vida más sedentario y la obesidad [1].

### **3.3 Obesidad y su relación con el Cáncer de Mama.**

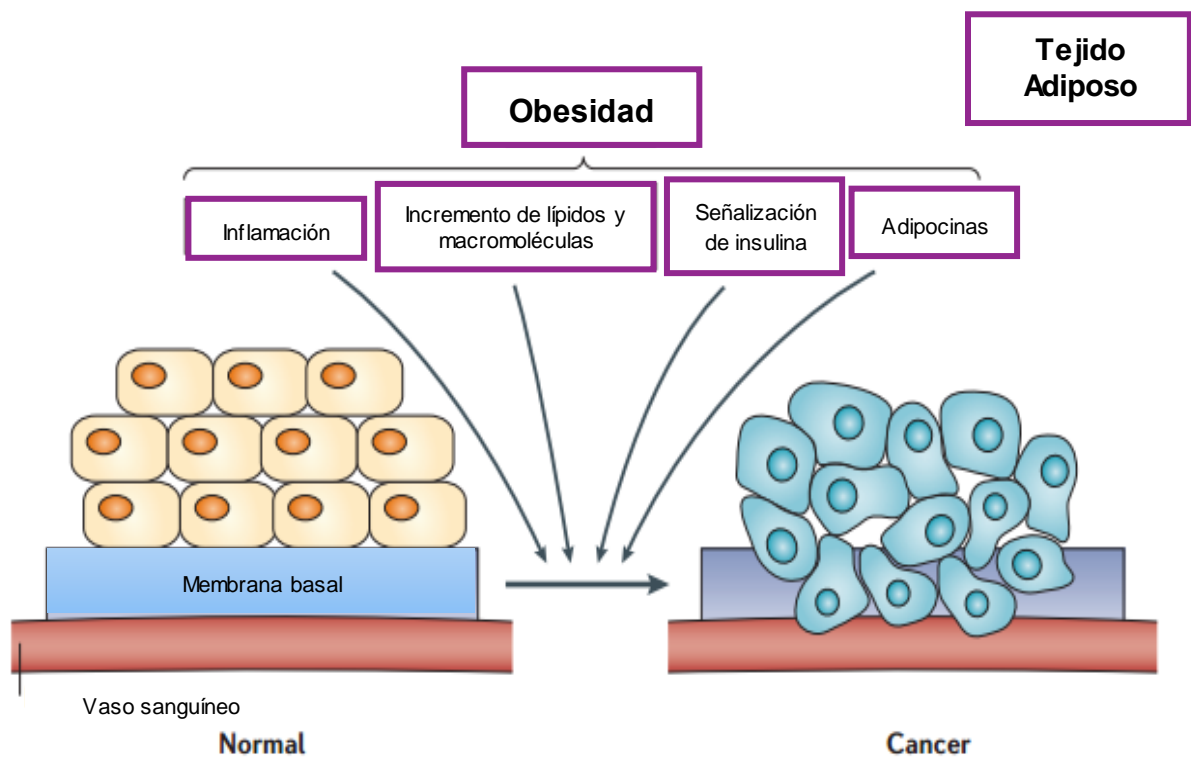
La obesidad es un exceso en la acumulación de tejido adiposo producida por la ingesta calórica que supera el gasto de energía. Con la actual epidemia de obesidad, datos epidemiológicos sugieren una asociación significativa entre el aumento del índice de masa corporal (IMC) y el desarrollo de varios tipos de cáncer entre ellos incluido el de mama, destacando que el exceso de masa corporal se asocia a un mal pronóstico en la progresión tumoral [2].

En el 2002 con base en estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) evaluó la relación entre la obesidad y el riesgo de cáncer, concluyendo que la prevención del aumento de peso y la actividad física podrían disminuir el riesgo de desarrollar cáncer de esófago, colon, endometrial, cáncer de mama, entre otros [51].

Con relación al cáncer de mama, se ha señalado que las mujeres con inactividad física y/o mujeres obesas tienen un riesgo aumentado de cáncer postmenopáusico, pero no premenopáusico [53]. Por lo tanto, muchas mujeres con cáncer de mama son más pesadas y más inactivas físicamente que la población general en el momento del diagnóstico. Esto subraya la importancia de las asociaciones adversas de la obesidad con los resultados de cáncer de mama [54].

En la última década se ha determinado que además de su función de almacenar el exceso de calorías en forma de lípidos, el tejido adiposo participa a través de diversos mecanismos en el desarrollo del cáncer debido a que actúa también como un órgano endócrino activo que secreta varias adipocitocinas, entre las que se encuentre las que se

encuentra la Leptina y la Adiponectina, así como citocinas inflamatorias, regulando procesos fisiológicos y patológicos, como el apetito, la sensibilidad y resistencia a la insulina, inflamación, inmunidad, hematopoyesis y angiogénesis [52, 56]. Un trastorno metabólico sistémico como la obesidad crea un ambiente de apoyo para la proliferación de células tumorales. Los mecanismos más estudiados para explicar el vínculo obesidad y cáncer de mama se pueden observar en la Figura 3 y son la resistencia a la insulina, la producción de hormonas endógenas, la angiogénesis, la obesidad inducida por la hipoxia, la modulación inmune, las citoquinas inflamatorias y la secreción de adipocitocinas [55].



**Figura 3.** Vías que pueden vincular la obesidad con el desarrollo del cáncer.

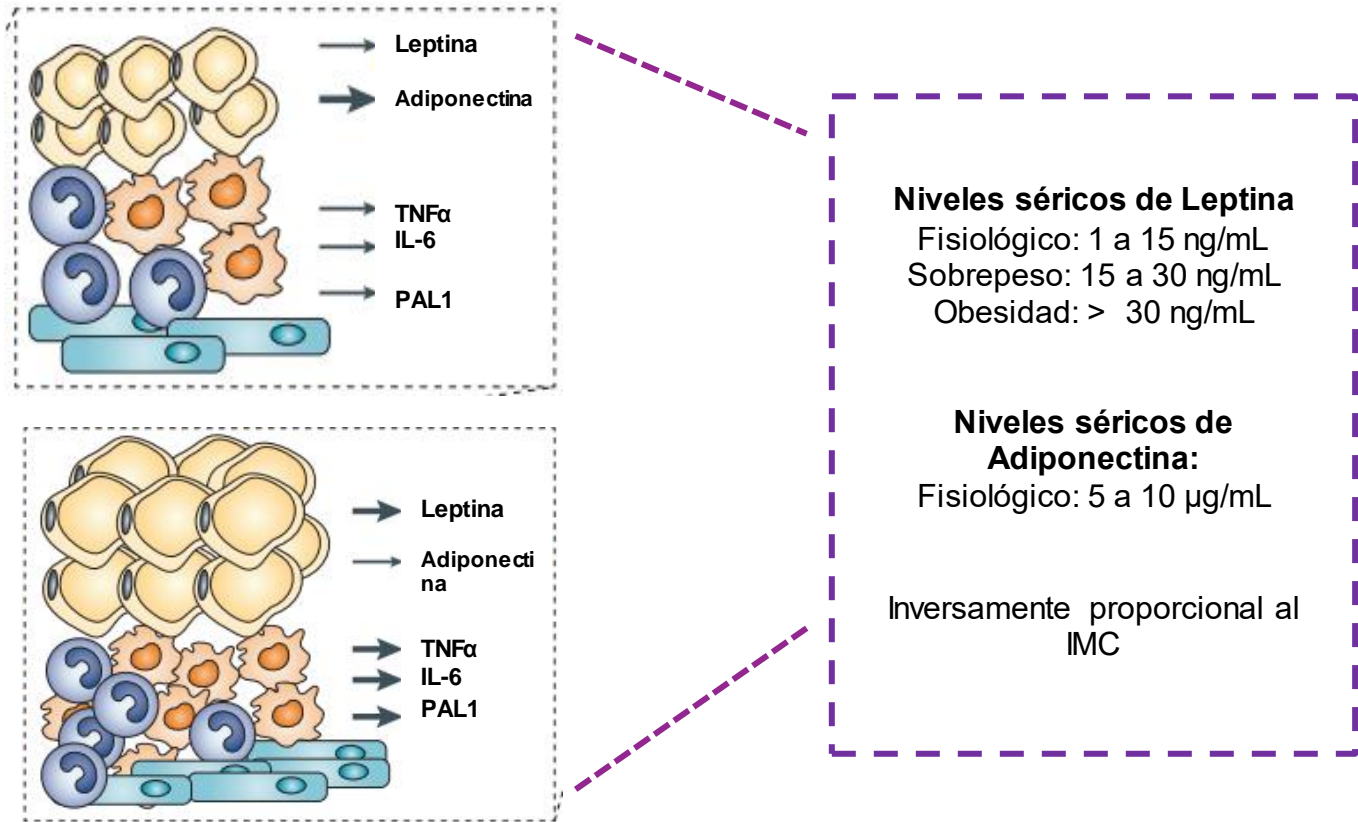
Fuente: Khandekar *et al.*, 2011

La modificación de la biología del tejido adiposo en obesidad altera en la producción y secreción de adipocitocinas. Los sujetos obesos presentan disminución del nivel de Adiponectina circulante y aumento de la concentración plasmática de Leptina. Esta alteración en la secreción de adipocitocinas por los depósitos adiposos puede explicar la

relación entre la obesidad y el desarrollo del cáncer de mama [5, 6] debido a que pueden actuar sobre el tejido mamario de forma endocrina a través de depósitos adiposos externos, en una vía parácrina a través de tejido adiposo mamario y fuentes no adiposas incluyendo células estromales y células inflamatorias, y en una acción autócrina a través de un tumor mamario. La estructura de la glándula mamaria favorece una estrecha interacción entre el tejido adiposo mamario y el tejido mamario y sugiere que las adipocinas producidas por el tejido adiposo mamario y el microambiente de las células tumorales pueden ser el principal vínculo entre la obesidad y la progresión de la enfermedad y la metástasis [61].

Debido a que los adipocitos representan la mayoría del tejido mamario, una hipótesis reciente los coloca con sus funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas en el centro de la tumorigénesis mamaria. El exceso de adipocitos en el sobrepeso y la obesidad se conectan con las vías moleculares para la carcinogénesis por medio de la activación de la inmunidad innata y adquirida, el aumento de la disponibilidad de sustrato a las células neoplásicas de mama, así como la exposición de las células a factores de crecimiento y adipocitocinas protumorigénicas [53, 56, 57]. Así mismo al activar a sus receptores, las adipocitocinas pueden influir en la proliferación, migración e invasión de células tumorales, regular la producción de proteínas epiteliales derivadas, proteínas angiogénicas y factores de crecimiento y estimular otras células en el microambiente tumoral a invadir y proliferar [61].

La alteración de la secreción de estas adipocitocinas en obesidad se pueden observar de forma resumida en la Figura 4. El incremento en la liberación de Leptina, VEGF, IL-6 y TNF- $\alpha$  y la disminución de la secreción de Adiponectina, podrían estar ligados a diferentes mecanismos carcinogénicos incluyendo diferenciación celular, apoptosis, proliferación celular, angiogénesis y alteración de los niveles de hormonas sexuales esteroideas. Todo esto indica que la Leptina tendría un efecto promotor del cáncer mientras que la Adiponectina tendría un efecto protector [4].



**Figura 4.** Cambios en el tejido adiposo en la obesidad.

Fuente: Modificado de Khandekar et al., 2011

### 3.4 Leptina

La Leptina se traduce como una proteína de 167 aminoácidos y tiene un peso molecular de 16 kD y es producto del gen OB o gen de la Leptina humana, con una secuencia señal secretora amino-terminal de 21 aminoácidos. La secuencia señal es funcional, y resulta en la translocación de Leptina en los microsomas con la subsiguiente eliminación del péptido señal [58]. Por lo tanto, la Leptina circula en la sangre como proteína de 146 residuos de aminoácidos. Es una adipocitocina pleiotrópica que regula la ingesta de alimentos, el gasto energético, la inmunidad, inflamación, hematopoyesis, la diferenciación celular y la proliferación [59, 60].



Las funciones más importantes de la Leptina incluyen la regulación de la homeostasis energética, la función neuroendocrina y el metabolismo. Otros efectos de la Leptina que implican la regulación de la función inmune y el metabolismo óseo, las cuales están bajo investigaciones [62,63].

Su síntesis ocurre principalmente en el tejido adiposo blanco, pero estudios recientes han confirmado que algunos otros tejidos expresa Leptina, incluyendo placenta, ovarios, músculo esquelético y el estómago. Se estimula tras la ingesta de alimentos y disminuye durante el ayuno y en la diabetes mellitus, y los niveles están positivamente correlacionados con la cantidad de grasa corporal. En la actualidad se sabe que su producción es modulada por la insulina, glucocorticoides y esteroides sexuales y que sus niveles sistémicos son proporcionales a la adiposidad corporal y fluctúa con cambios agudos en la ingesta calórica y la señalización de la cantidad de energía en el tejido adiposo [61].

Al igual que muchas otras hormonas, la Leptina se secreta de forma pulsátil y tiene una variación diurna significativa con niveles más altos en la noche y las primeras horas de la mañana. Los niveles circulantes de esta hormona reflejan principalmente la cantidad de energía almacenada en la grasa y los cambios secundarios agudos en la ingesta calórica [66].

La expresión del gen está básicamente restringida al tejido adiposo y sus niveles están íntimamente relacionados con el almacenamiento de triglicéridos y con la masa del tejido adiposo [64]. Juega un papel clave en la regulación estricta del peso corporal al inhibir el apetito y aumentar el consumo de energía. Los defectos en la producción de esta adipocitocina conducen a la obesidad mórbida en humanos y roedores [65].

La concentración de Leptina circulante aumentan marcadamente en la obesidad, como se muestra tanto en estudios en humanos como en estudios de varios tipos de animales obesos. De hecho, en sujetos humanos hay un alta correlación entre el IMC y la Leptina circulante. Por lo tanto, cuanto mayor es la cantidad de tejido adiposo, mayor es el nivel de la hormona [67-70].

La gran mayoría de los pacientes obesos tienen altos niveles de Leptina circulante, lo que ocasiona una resistencia o tolerancia a los efectos reductores de peso. Los mecanismos hipotalámicos por los cuales se cree que se genera una resistencia a Leptina incluyen: 1) defectos en el receptor ObRb, 2) inducción de inhibidores de la señalización de la Leptina, por ejemplo SOCS-3, y 3) una deficiencia en el transporte de la proteína a través de la barrera hematoencefálica [66, 76, 77].

Se ha estudiado la relación de la Leptina con el desarrollo del cáncer de mama debido a la sobreexpresión del gen de Leptina tanto en líneas celulares de cáncer de mama, como en tumores sólidos [54]. Se ha demostrado que esta proteína induce la proliferación, la supervivencia y el crecimiento celular de células tumorales estimulando vía de Jak/STAT3, ERK1/2 y fosfoinositol 3-quinasa, así como inducir la expresión de ciclina D1 entre varios mecanismos más [24, 78, 79].

### **3.4.1 Receptores de Leptina**

La Leptina lleva a cabo sus funciones mediante la activación de sus receptores, expresados tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos que incluyen hígado, corazón, riñones, pulmones, intestino delgado, testículos, ovarios, bazo, páncreas y tejido adiposo [71, 75].

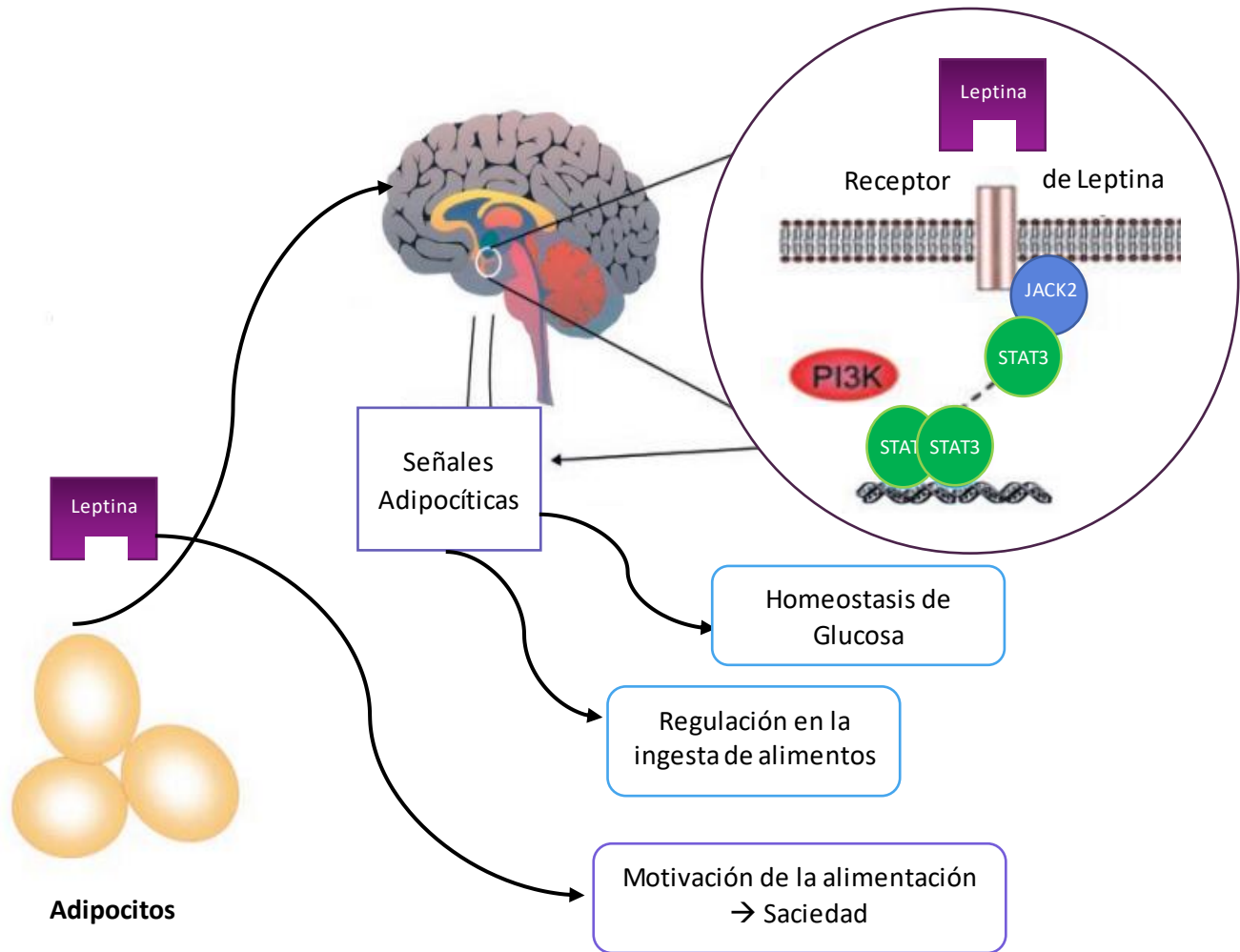
En la actualidad se han identificado 6 isoformas de estos receptores (ObRa – ObRf), generados gracias al empalme alternativo, los cuales pertenecen a receptores de citocinas clase I y contiene un sólo dominio transmembranal. La región extracelular de estos receptores se caracteriza por la presencia de múltiples dominios, cada uno se caracteriza por residuos de consenso únicos. Para los receptores de citoquinas, el dominio CK-F3 parece formar el sitio de unión al ligando y el receptor de Leptina contiene dos dominios CK-F3 repetitivos [71, 75].

Todas las isoformas del receptor de Leptina comparten un dominio extracelular ligando-ligando idéntico de 816 aminoácidos, mientras que el dominio intracelular en el extremo C-terminal es diferente [71, 75].

La forma larga del receptor ObRb (la isoforma del receptor largo de Leptina), es la única que tiene la capacidad de transducir señales y se expresa casi exclusivamente en el hipotálamo, un sitio importante para la regulación de la homeostasis energética y la función neuroendocrina. Se cree que la isoforma ObRa (la isoforma de receptor de Leptina corta) juega un papel importante en el transporte de la Leptina a través de la barrera hematoencefálica y es capaz de activar cascadas de señalización. La forma soluble (ObRe) del receptor, por su parte, tiene una gran afinidad por la proteína y se piensa que tiene el objetivo de regular las concentraciones plasmáticas de la misma [75].

Después de la unión de la Leptina a su receptor se produce la dimerización del receptor, lo que parece ser necesario para la actividad de señalización. Después de la unión a la Leptina y la homodimerización del receptor ObRb, ésta activa varias vías de transducción de señales, incluyendo el transductor JAK-STAT3, que es importante para la regulación de la homeostasis energética y el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que es importante para la regulación de la ingesta de alimentos y la homeostasis de la glucosa, cómo es posible observar en la Figura 5 [72, 73].

Los JAKs activados fosforilan los sitios de tirosina en el dominio intracelular del receptor, que sirven como sitios de acoplamiento para los dominios de homología Src (SH<sub>2</sub>, SH<sub>3</sub>) que se producen en todos los STATs. El dominio intracelular fosforilado proporciona un sitio de unión para un dominio STAT. Las proteínas STAT activadas dimerizan y se trasladan al núcleo, donde se unen al ADN y activan la transcripción. La activación de ObRb también puede fosforilar JAK conduciendo a la activación del sustrato de receptor de insulina (IRS-1) y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Tras la unión a la Leptina al receptor OB-Ra se fosforila el IRS-1 y en consecuencia activa MAPK [71].



**Figura 5.** Acción de la Leptina.

Fuente: Modificado de Sader *et al.*, 2003.

### 3.5 Adiponectina

La Adiponectina es una proteína de 28–30 kDa constituida por 244 aminoácidos que muestra similitudes estructurales con el colágeno y el TNF $\alpha$ , producida exclusivamente en el tejido adiposo blanco. La adiponectina es muy abundante en la circulación con concentraciones plasmáticas que varían de 5 a 30  $\mu\text{g/mL}$ , representando hasta el 0.01%

del total de las proteínas plasmáticas y su concentración plasmática tiene una relación inversamente proporcional a la obesidad, IMC, acumulación de grasa visceral e insulino-resistencia [80, 84, 85].

Los niveles medianos de adiponectina en individuos sanos con un IMC entre 20 y 25 kg/m<sup>2</sup> son de aproximadamente 8 µg/mL para los hombres y de 12.5 µg/mL para las mujeres [81]. Dimorfismo sexual se ha observado en la expresión de adiponectina, con los hombres que muestran niveles más bajos que las mujeres [86].

La Adiponectina se puede encontrar en cinco configuraciones diferentes, con diversos efectos biológicos dependiendo del ensamble de los homo-oligómeros de diversos pesos moleculares: la Adiponectina globular (gAPN), Adiponectina de longitud total (fAPN), Adiponectina de bajo peso molecular, Adiponectina de peso molecular medio y Adiponectina de alto peso molecular (HMW) [82]. La secuencia peptídica monomérica se compone de cuatro regiones: un péptido amino terminal, una región hipervariable corta, un dominio de tipo colágeno que contiene 22 repeticiones Gly-X-Pro o Gly-X-Y y un dominio globular carboxi-terminal C1q [87].

La gAPN se genera a través del producto de escisión proteolítica de la fAPN y contiene la cabeza globular sin el dominio de tipo colágeno que permite la formación de trímeros pero no de oligómeros de HMW [88, 89]. Recientemente, se ha determinado que la forma monomérica estimula la activación de AMPK en el músculo y aumenta la oxidación de ácidos grasos y la captación periférica de glucosa. Además, un aumento de la gAPN se ha correlacionado con la mejora de todo el cuerpo del metabolismo energético y de las funciones del tejido adiposo [90-92].

La isoforma de HMW representa la forma biológicamente activa de la adiponectina y está fuertemente relacionada con la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular [56, 83].

Esta adipocitocina es considerada como una hormona de protección a partir de las funciones metabólicas que lleva a cabo en el músculo esquelético y el hígado. En el músculo desempeña un papel importante en la regulación de la glucosa por medio de

una potente actividad sensibilizante a la insulina, que afecta a la captación de glucosa en el músculo a través de la activación de proteincinasa dependiente de AMP (AMPK) y el receptor alpha activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR  $\alpha$ ). En el hígado participa en la homeostasis de lípidos mediante la oxidación de los ácidos grasos y disminuye la inflamación a través de la vía PPAR $\alpha$ , por lo que se ve implicada en la fisiopatología de la aterosclerosis por su actividad anti-inflamatoria. La adiponectina activa el transporte de glucosa e inhibe la gluconeogénesis a través de la AMPK [4, 84, 85, 93].

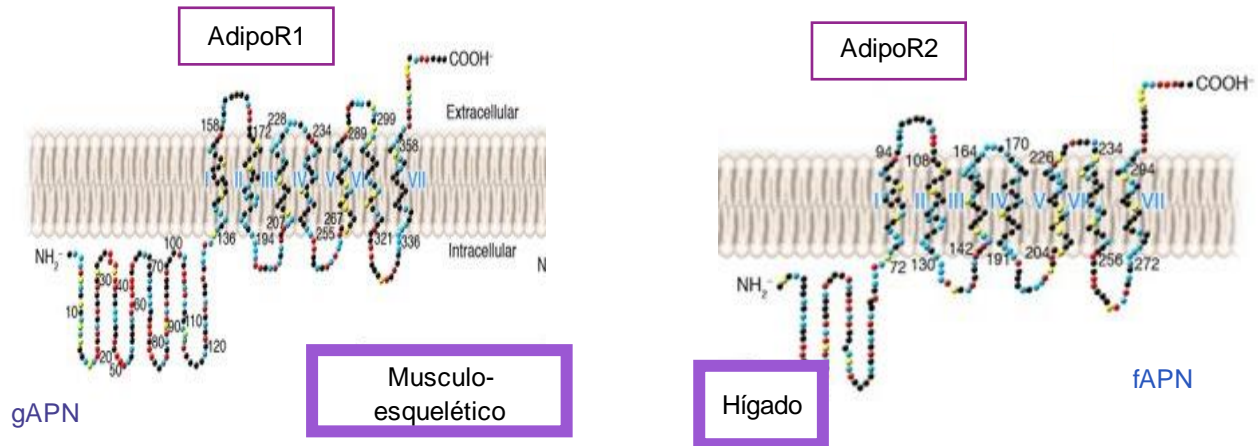
En el páncreas, la adiponectina actúa sobre la proliferación celular estimulando la secreción de insulina [94]. En los tejidos adiposos, la adiponectina aumenta la captación de glucosa basal y mejora la captación de glucosa estimulada por insulina a través de la activación de AMPK [93]. Además, los estudios *in vitro* demostraron que la adiponectina regula el metabolismo lipídico de la grasa que inhibe la lipólisis [95, 96].

Los niveles bajos de Adiponectina son el denominador común de los factores de riesgo que sintetizan el síndrome metabólico como la hipertensión, la dislipidemia, la obesidad, la hiperglucemia y la resistencia a la insulina [83]. Así mismo, se ha encontrado en estudios *in vivo* que la hipoadiponectinemia tiene una asociación inversa con el riesgo de resistencia a la insulina y neoplasias malignas asociadas a obesidad (cáncer de mama, de colon, renal, algunas neoplasias hematológicas de origen mieloide, así como cáncer gástrico y próstata) [56].

### **3.5.1 Receptores de Adiponectina**

La Adiponectina ejerce su función a través de sus receptores específicos. Dos receptores principales denominados AdipoR1 y AdipoR2, los cuales son receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembranales, tal y como se pueden observar en la Figura 6. Como miembros de la familia PAQR (progestina y receptor AdipoQ), en el

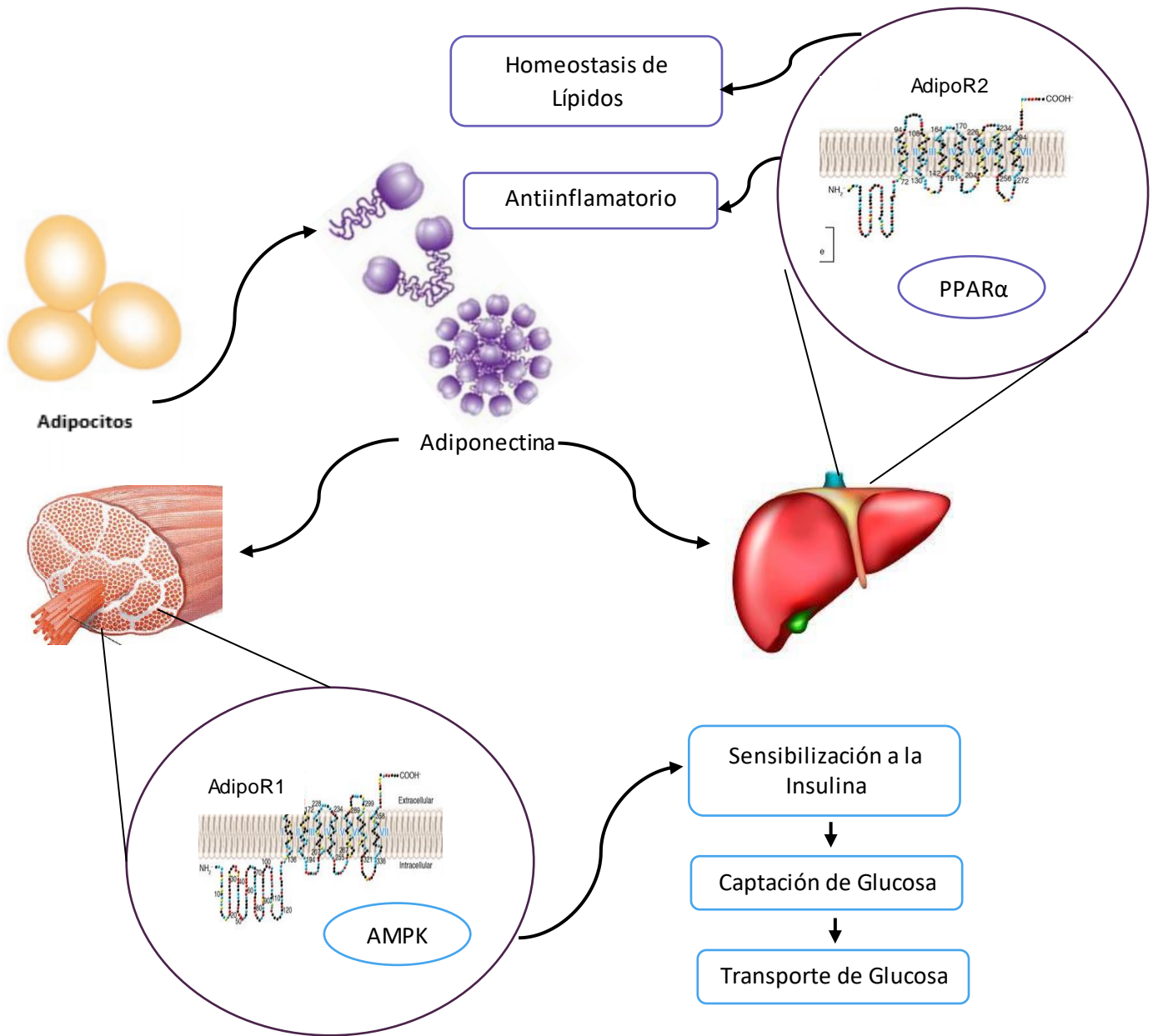
extremo N-terminal se encuentra en la región citoplásmica de la célula mientras que el extremo C-terminal encontrado externamente [87, 97].



**Figura 6.** Receptores AdipoR1 y AdipoR2

AdipoR1 muestra una expresión ubicua incluyendo en el músculo esquelético y el hígado, mientras AdipoR2 se expresa principalmente en hígado [97]. Ensayos de unión de ligando revelaron que AdipoR1 puede actuar como un receptor de alta afinidad para adiponectina globular, pero también puede unirse a adiponectina de longitud completa, y AdipoR2 muestra afinidad intermedia para moléculas de adiponectina tanto globulares como de longitud completa [98].

La unión de la adiponectina a sus receptores aumenta la actividad de la AMPK y PPAR- $\alpha$ , favoreciendo la oxidación de ácidos grasos y la entrada de glucosa a los tejidos, como se observa en la Figura 7 [99]. El sistema AMPK activado desempeña un papel vital en la regulación del metabolismo energético y la quiescencia celular. Así mismo, la adiponectina disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno y, por tanto, inhibe la proliferación de las células. La activación de AMPK parece ser mediada principalmente por AdipoR1, mientras que la activación de PPAR- $\alpha$  parece ser mediada por AdipoR2 [100, 101].



**Figura 7.** Acción de la Adiponectina.

Estudios han demostrado que la Adiponectina por medio de la activación de sus receptores AdipoR1 y AdipoR2, induce la inhibición de la migración [102], proliferación [103, 104] y supervivencia [105] celular de distintos tipos de células incluyendo las células musculares lisas aórticas, células endoteliales y varios tipos de células cancerosas, entre ellas las células de cáncer de mama generando un efecto protector contra esta enfermedad [106].



### 3.6 Líneas Celulares de Cáncer de mama

En este trabajo de investigación se determinó utilizar tres líneas celulares representativas de la clasificación molecular triple positivo (MCF-7), triple negativo (MDA-MB231) y BRCA mutado (HCC1937), cuyas características están representadas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características moleculares de las Líneas celulares de cáncer de mama.

| Línea Celular | Receptor Estrógenos | Receptor Progesterona | Receptor HER2 | Mutación en BRCA |
|---------------|---------------------|-----------------------|---------------|------------------|
| MCF-7         | +                   | +                     | +             | -                |
| MDA-MB231     | -                   | -                     | -             | -                |
| HCC1937       | -                   | -                     | -             | +                |

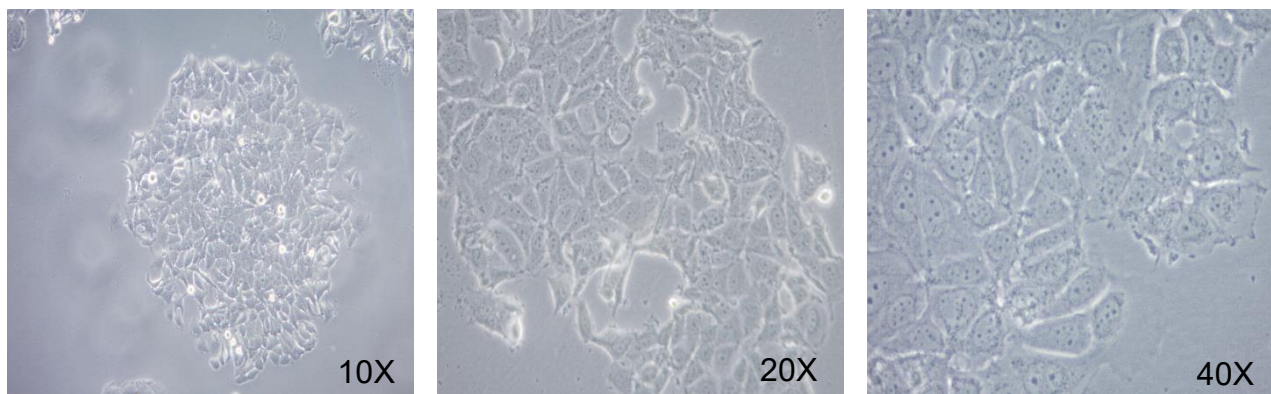
#### 3.6.1 MCF-7

MCF-7 es una línea celular de cáncer epitelial ampliamente estudiada derivada del adenocarcinoma de mama la cual tiene características de epitelio mamario diferenciado y se aisló por primera vez en 1970 del tejido mamario de una mujer caucásica de 69 años de edad. La paciente se había sometido a una mastectomía de su seno derecho para un tumor benigno y una mastectomía radical de su mama izquierda para un adenocarcinoma maligno 7 y 3 años, respectivamente, antes de que se iniciara el cultivo primario de células [107, 108].

Las células MCF-7 son células adherentes bastante grandes, con un tamaño de célula típico que mide 20-25 micras. Cuando se cultiva *in vitro*, la línea celular es capaz de formar cúpulas y las células epiteliales crecen en monocapas como se observa en la

Figura 8. A pesar de que las células MCF-7 son fáciles de propagar, generalmente son una población de crecimiento lento. El tiempo promedio de duplicación de MCF-7 es 29 h [108].

Las células MCF7 se pueden utilizar para detectar la implicación de PI3K y MAPK, junto con la fácil detección de ERK y la fosforilación de Akt. Además, a través de receptores de estrógenos citoplásmicos estas células tienen la capacidad de procesar estradiol. Es una línea celular positiva para el receptor de estrógenos, progesterona y Her2 [108, 145].



**Figura 8.** Cultivo celular de células de cáncer de mama MCF-7.

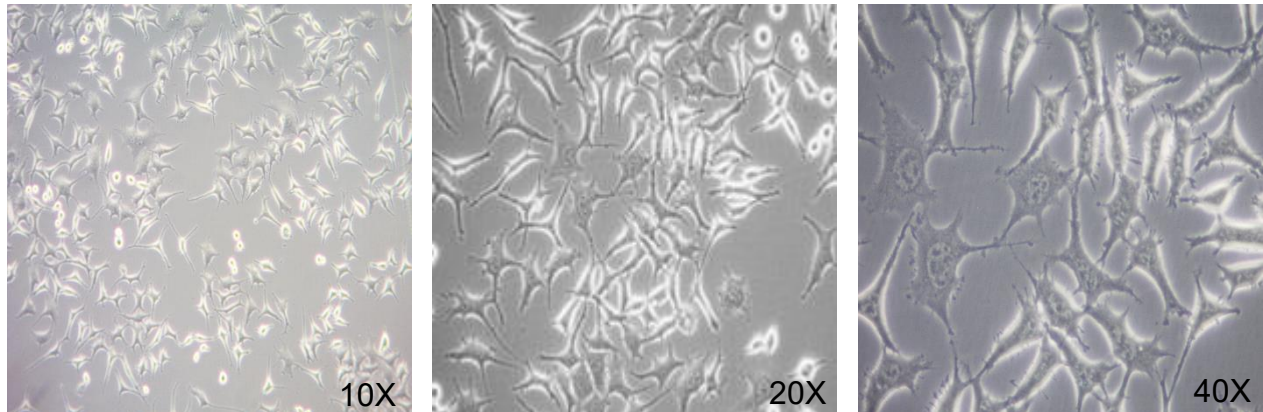
### 3.6.2 MDA-MB231

La línea celular MDA-MB-231 es una de las más utilizadas para el estudio experimental in vitro del cáncer de mama hormono-independiente. Estas células fueron aisladas por Cailleau y sus colaboradores en 1973, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente caucásica de 51 años con cáncer de mama [109].

Son células adherentes con morfología de tipo epitelial como se observa en la Figura 9, y presentan un crecimiento extraordinariamente rápido en medios de cultivo poco enriquecidos, esto derivado de una regulación autócrina de la secreción en el medio de factores de crecimiento celular. Poseen abundantes receptores de membrana para el

factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformador alfa (TGF  $\alpha$ ) [110, 111].

Las células de cáncer de mama MDA-MB231 son un huésped de transfección adecuado y es una línea celular negativa para el receptor de estrógenos, progesterona y Her2 [111, 145].



**Figura 9.** Cultivo celular de células de cáncer de mama MDA-MB231.

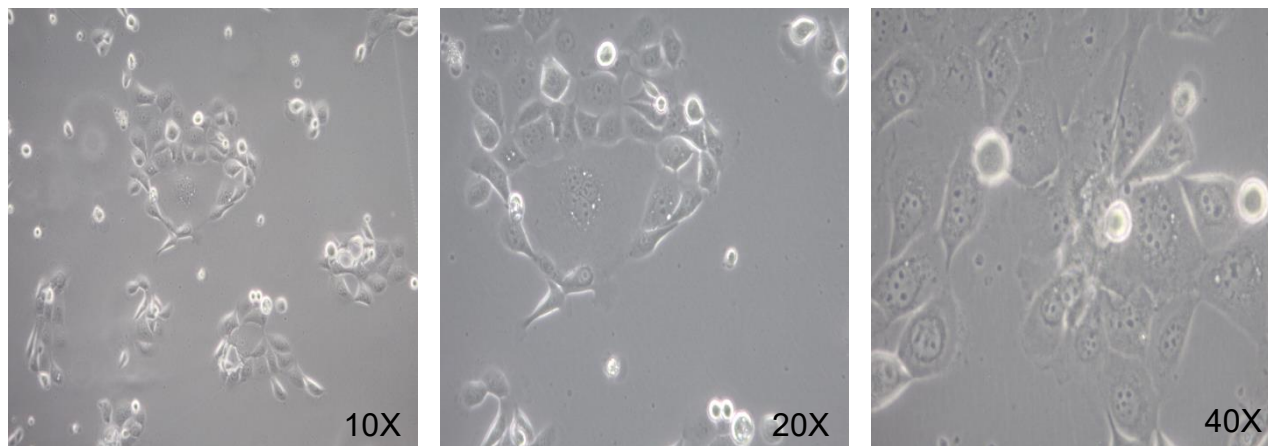
### 3.6.3 HCC1937

HCC1937 es una línea celular de cáncer epitelial derivada de un tumor ductal primario infiltrante de grado III de una paciente caucásica de 24 años de edad con una mutación germinal en BRCA1 [143].

Son células adherentes, las cuales crecen en monocapa y presentan grandes vacuolas como se observa en la Figura 10 [112].

El análisis de BRCA1 reveló que la línea celular es homocigótica para la mutación de BRCA1, la cual es la inserción de una Citosina en el nucleótido 5382 [143, 112].

Las células HCC1937 son negativas para la expresión de del receptor de estrógeno, el receptor de progesterona, Her2-neu y para la expresión de p53 [112, 113].



**Figura 10.** Cultivo celular de células de cáncer de mama HCC1937.

### 3.7 Antecedentes

Se han caracterizado líneas celulares de cáncer de mama para Leptina y su receptor y se ha evidenciado el efecto de la Leptina sobre la proliferación celular.

| Autor/año  | Trabajo   |
|--|---|
| Jardé et al., 2009;<br>Dieudonne et al., 2002;<br>Soma et al., 2008. | Se caracterizó las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y T47D para Leptina y su receptor (Ob-R) [114-116].               |
| Yin et al., 2004;<br>Somasundar et al.,<br>2003.                     | Estudio del efecto de Leptina sobre el crecimiento celular en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, SK-BR-3, T47D y ZR-75-1 [78,117]. |

La actividad promotora de la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama por parte de la Leptina se ha evidenciado en experimentos *in vitro*.

| Autor/año   | Trabajo  |
|---|--|
| Frankenberry <i>et al.</i> , 2006; Nkhata <i>et al.</i> , 2009.                   | Se encontró que la Leptina induce de supervivencia de las células de cáncer de mama a través de la activación de la vía de PI3K/Akt activando la fosforilación de Akt [120, 121].  |
| Okumura <i>et al.</i> , 2002.   | La Leptina estimula la expresión proteica de PKC-alfa, además resultados indican que la proliferación celular puede activarse mediante la alteración de los puntos de control celular pues regula la cdk2 y la ciclina D1 (transición del ciclo celular G1 a S) [123].                             |
| Yin <i>et al.</i> , 2004; Fusco <i>et al.</i> , 2010; Binai <i>et al.</i> , 2010. | Se determinó que la Leptina estimula directamente la vía STAT3 y la regulación positiva de c-myc, tanto a nivel de mRNA como de proteína [78, 124,125].  |
| Chen <i>et al.</i> , 2006.  | En células de cáncer de mama ZR-75-1 se determinó que la proliferación celular inducida por la Leptina se asocia con una expresión mejorada de c-myc y ciclina D1 [126].   |
| Gonzalez <i>et al.</i> , 2006.  | En las células de cáncer mamario de ratón 4T1, el tratamiento con Leptina aumenta no sólo la expresión de la ciclina D1, sino también la del VEGF y su receptor VEGF-R2, lo que sugiere que esta proteína puede promover la angiogénesis en el cáncer de mama mediante señalización de VEGF [127]. |
| Perera <i>et al.</i> , 2008.  | Perera <i>et al.</i> han identificado más de 64 genes regulados por la Leptina, incluidos los de factores de crecimiento, reguladores del ciclo celular, proteínas de la matriz extracelular (ECM) y genes asociados con metástasis [128].   |

En la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 la Leptina estimula el crecimiento celular activando las vías de señalización STAT3 y ERK1/2 [147].  
 Naviglio *et al.*, 2009.

Los estudios anteriores sugieren que la Leptina ejerce sus efectos neoplásicos a través de dos mecanismos: 1) actuando directamente sobre las células de cáncer de mama estimulando las vías de señalización mediadas por receptor que conducen al crecimiento, migración e invasión de células tumorales, 2) estimulando el crecimiento tumoral, la supervivencia celular y la transformación, mediante la amplificación de la señalización del RE [59, 118, 119].

Por otro lado, se han caracterizado líneas celulares de cáncer de mama para Adiponectina y sus receptores.

| Autor/año  | Trabajo   |
|--|---|
| Jardé <i>et al.</i> , 2009;<br>Takahata <i>et al.</i> , 2007;<br>Nakayama <i>et al.</i> , 2008.        | Los receptores de Adiponectina AdipoR1 y AdipoR2 y la expresión de la proteína se han caracterizado en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, incluyendo MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3 y T47D [114,129, 130].                          |
| Nakayama <i>et al.</i> , 2008.   | Nakayama <i>et al.</i> , señaló que siRNA contra AdipoR1 limita la actividad anti-proliferativa de la Adiponectina en células de cáncer de mama T47D y limita a alrededor del 50% de la actividad anti-proliferativa en MDA-MB-231 [130]. |
| Dieudonne <i>et al.</i> , 2006;<br>Nakayama <i>et al.</i> , 2008;<br>Wang <i>et al.</i> , 2006; Arditi | Numerosos estudios han documentado el potencial anti-proliferativo de la Adiponectina en varias líneas celulares de cáncer de mama, incluyendo MCF-7, MDA-MB-231 y T47D [103, 114, 130, 132-134].   |

*et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2005; Jardé *et al.*, 2009.

Dieudonne *et al.*, 2006. En células MCF-7, Dieudonne *et al.*, Encontró una baja regulación en la ciclina D1 y la expresión de la proteína c-myc [103].

Brakenhielm *et al.*, 2004. Inhibición por Adiponectina de la migración y proliferación de células endoteliales in vitro, previniendo la formación de nuevos vasos sanguíneos [102].

Grossmann *et al.*, 2008. Inhibición de la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama negativas para Era [104].

Delort *et al.*, 2012. Actividad apoptótica de la Adiponectina por medio de la activación de las caspasas, Bax, TP53 y MX1 e inhibiendo la activación de Bcl2 y BAG1 [4].

Nakayama *et al.*, 2008; Korner *et al.*, 2007. En líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-245, MDA-MB-436, T47D y MCF10a.) mayor expresión de AdipoR1 en comparación con AdipoR2 (2.7 a 4.2 veces), ninguna de las líneas exhibía una expresión intrínseca de la Adiponectina [130, 136].

Lee *et al.*, 2014. Adiponectina es factor predictor del éxito o del fracaso del tratamiento en pacientes con cáncer de mama. Niveles elevados de Adiponectina sérica están asociados a una supervivencia de esta enfermedad en pacientes con cáncer de mama [150].

### 3.8 Justificación

La obesidad es uno de los factores más reconocidos en el desarrollo del cáncer de mama, y el tejido adiposo juega un papel muy importante en esta patología debido a la secreción de sus diversas citosinas, principalmente Leptina y Adiponectina. En los últimos años se han estudiado estas proteínas y su implicación en el desarrollo y progreso del cáncer de mama, sin embargo, la base molecular de esta asociación no es bien conocida y muy pocos son los que han estudiado a los receptores de Adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) y la influencia de la Leptina sobre ellos.

Es por ello que hoy en día se requiere elucidar los mecanismos por los cuales niveles altos de Leptina en el organismo generan un aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer de mama y si esta proteína tiene una influencia sobre AdipoR1 y AdipoR2, la cual podría afectar la acción anti-proliferativa de la Adiponectina.

### 3.9 Hipótesis

La expresión de los receptores de Adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, se encontrará disminuida en las líneas celulares que recibieron altas concentraciones de Leptina.

### 3.10 Objetivos

**Objetivo General:** Determinar la expresión de los receptores AdipoR1 y AdipoR2, modulada por concentraciones diferenciales de Leptina en un modelo de obesidad asociado a cáncer de mama en líneas celulares MCF-7, MDA-MB231 y HCC1937.



### **Objetivos Específicos:**

- Demostrar que los receptores AdipoR1 y AdipoR2, se encuentran expresados en líneas celulares.
- Caracterizar las líneas celulares con Leptina, Adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2.
- Analizar la expresión de los receptores AdipoR1 y AdipoR2, en líneas celulares representativas de la clasificación molecular triple negativa, triple positiva y BRCA mutado, estimuladas con Leptina.

## V. PROCEDIMIENTO

### 4.1 Cultivo Celular

Para este estudio se emplearon las líneas celulares MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937. Se cultivaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 85% de humedad, con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco®, USA) y Dulbecco's Modified Eagle's (Caisson Labs, USA) enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco®, USA) inactivado con calor (30 min a 57° C, baño María. Con recambio del medio cada tercer día.

### 4.2 Conteo celular

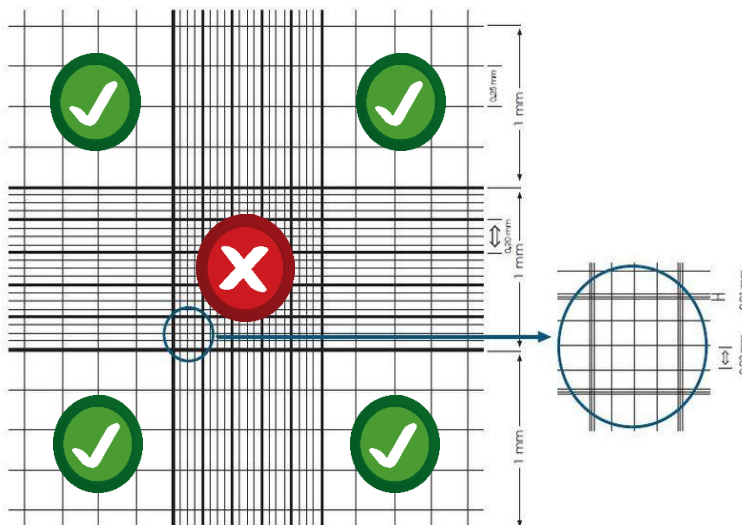
El conteo para la siembra de una cantidad específica de células, para cada uno de los experimentos, se llevó a cabo por el método de Azul Tripano. Una vez alcanzada una confluencia del 70-80% de cada línea celular se procedió a despegarlas con Tripsina al 0.05% (Gibco®, Canadá). Las células recuperadas se centrifugaron 3 min a 1500 rpm; el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo. De esa suspensión se tomaron 10 µL y se mezclaron con 90 µL de Azul Tripano.

Para el conteo celular se tomaron 10 µL de la mezcla anterior y se colocaron en una cámara de Neubauer. Se contaron solamente las células vivas, es decir las refringentes, que se encontraron en los 4 cuadrantes de las esquinas de la cuadrícula de la cámara, como se muestra en la Figura 11.

Se obtiene el promedio de cada conteo y el resultado se multiplica por 10 (primera dilución) y luego por 10,000 (factor de la cámara).

$$\begin{aligned} & (Cuadrante1 + Cuadrante2 + Cuadrante3 + Cuadrante4) \div 4 \\ & = \textit{Promedio de Cuadrantes} \end{aligned}$$

$$(\textit{Promedio de Cuadrantes}) \times 10 \times 10,000 = \textit{Células/mL}$$



**Figura 11.** Cámara de Neubauer, cuadrantes utilizados para el conteo celular.

El número de células utilizado en cada uno de los experimentos fue de 5,000 y 20,000 células, determinado por el promedio de células viables soportadas por la superficie del pozo de la placa utilizada (96 y 24 pozos) y el factor de crecimiento de cada línea celular, impidiendo de esta manera interferencias en los resultados ocasionado por muerte celular como consecuencia de la falta de espacio para el crecimiento de las células.

### 4.3 Inmunohistoquímica

Se determinó la expresión de Estrógenos (RE), Progesterona (RP), Her2 y Ki67 por medio de Inmunohistoquímica para cada línea celular.

Una vez alcanzada una confluencia del 70% las células se lavaron con PBS (Gibco®, USA) y se levantaron con Tripsina al 0.05%. Las células recuperadas se centrifugaron 3 min a 1500 rpm y el botón celular se utilizó para preparar laminillas fijándolas con acetona. Posteriormente se realizó la recuperación de epítopes de las células con Citrato de Sodio 0.1% pH 6.2 (Dako, USA), inactivando la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0.9%. Se lavaron las láminas en agua destilada y se dejaron reposar durante 5 minutos en PBS [138].

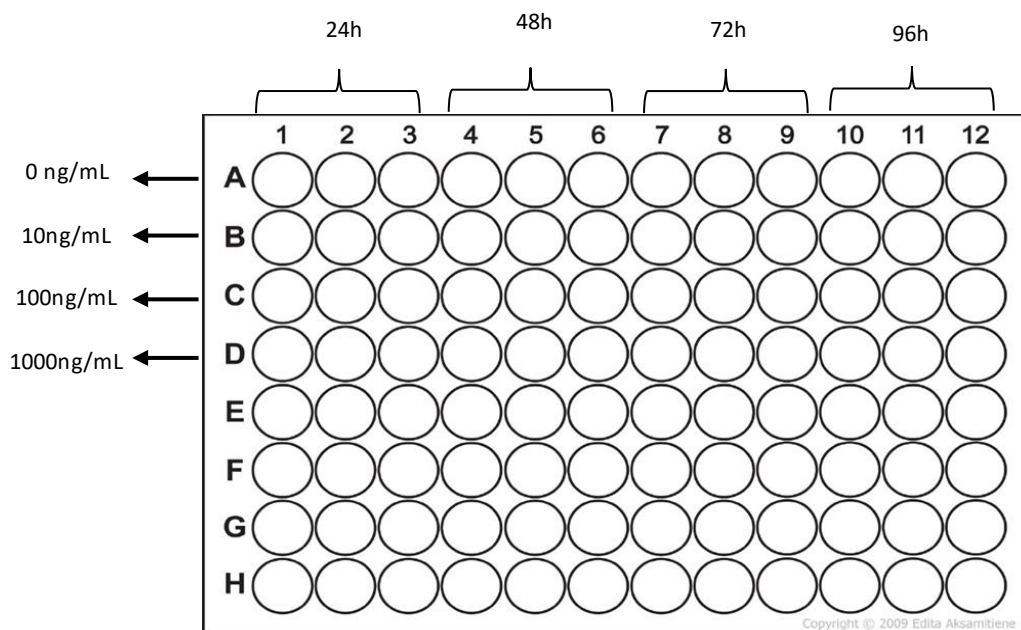
Las células se incubaron durante 45 minutos con los siguientes anticuerpos: RE 1:35 (Dako, USA), RP 1:50 (Dako, USA), Her2 1:50 (Biocare, USA), Ki67 1:100 (Biocare, USA)

A continuación se añadió el sistema de detección de dos pasos Mach 1 Universal HRP-Polymer Detection (Biocare, USA) durante 30 minutos cada uno. La reacción se visualizó con 3,3'diaminobencidina (Leica Biosystems, USA) y se tiñó con hematoxilina de Hill [138].

#### **4.4 Curvas de viabilidad celular**

El estudio de proliferación celular se llevó a cabo por medio del ensayo de Cristal Violeta. Para este propósito dos grupos de 5,000 células de MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937 n=3 se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos y se dejaron crecer durante 24 h (Grupo 1) y 48 h (Grupo 2). Posteriormente las células de cada grupo cada 24 h durante 96 h se lavaron con PBS y se adicionó medio de cultivo fresco (al 5% de SFB) con estímulo de Leptina (Human Protein, Recombinant Native Active, Life Technologies™, USA) en concentraciones de 0 ng/mL (Ctrl-), 10 ng/mL, 100 ng/mL y 1000 ng/mL [114]. En la Figura 12 se puede observar el acomodo de las células en cada pozo para la adición del estímulo de Leptina. La disminución del SFB se realizó para disminuir los factores de crecimiento que pudieran interferir con la acción de la Leptina [139].

Se evaluó la proliferación celular de cada línea por triplicado para cada concentración evaluada. Posterior a 24h de estímulo se fijaron las células con Glutaraldehído (Merck, Germany) al 1.1% durante 15 minutos y a continuación se adicionó PBS hasta terminar las 96h de estímulo con Leptina para cada grupo. Al término del estímulo las células fijadas fueron teñidas con Cristal Violeta durante 15 minutos. La placa se lavó con agua y se colocó en cada pozo ácido acético al 10%. Inmediatamente la placa se leyó a una longitud de onda de excitación de 490nm y una longitud de emisión de 630nm en un lector de micro-placas (Stat Fax 2100 Microplate Reader, Awareness Technology Inc.).



**Figura 12.** Placa de 96 pozos utilizada para determinar la viabilidad de células de cáncer de mama que recibieron un estímulo de Leptina.

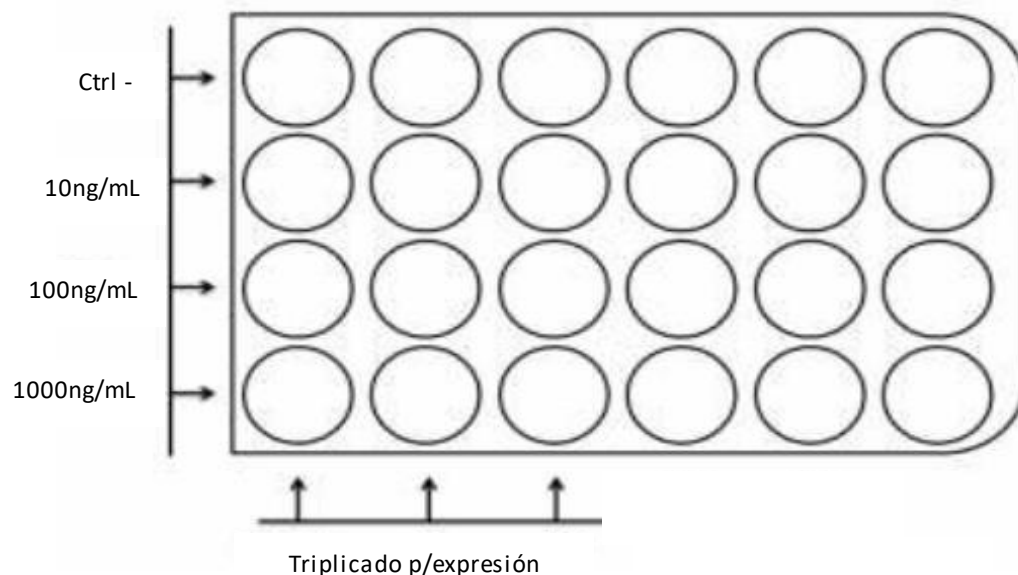
#### 4.5 Ensayo de expresión

La regulación de la expresión génica de los receptores de Adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, se evaluó por medio de adición de Leptina a las líneas celulares del estudio siguiendo la metodología de Jardé *et al.*, 2009 con ligeras modificaciones. Se sembraron

20,000 células de MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937 (n=3) en placas de 24 pozos como se describió anteriormente y se dejaron crecer durante 48 h.

Después de 24, 48, 72 y 96 horas se lavaron las células con PBS y se adicionó medio de cultivo fresco al 5% de SFB con estímulo de Leptina 0 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL y 1000 ng/mL. En la Figura 13 se puede observar el acomodo de las células en cada pozo para la adición del estímulo de Leptina en el ensayo de expresión de AdipoR1 y AdipoR2.

Al término del estímulo se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 400  $\mu$ L de TRizol® Reagent para llevar a cabo la extracción de mRNA de acuerdo al protocolo de uso (Ambion™).



**Figura 13.** Placa de 24 pozos utilizada para determinar expresión de AdipoR1 y AdipoR2 en células de cáncer de mama que recibieron estímulo de Leptina.

Una vez obtenido el mRNA, se llevó a cabo la obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de 2 $\mu$ g mRNA por medio de la reacción de Transcriptasa Reversa de acuerdo al protocolo de uso (High Capacity RNA-to-cDNA kit, Applied Biosystems, USA) obteniendo 20  $\mu$ L de cDNA.

El cDNA de los controles de cada línea celular se utilizó para determinar por PCR en punto final con HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN, Germany) la presencia de mRNA de Leptina, Adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, usando como gen control ACTB (Tabla 2). El programa utilizado para realizar la PCR fue 95°C por 15 min y 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min.

**Tabla 2.** Secuencia de oligos utilizados en PCR punto final.

| Gen          | Fw                           | Rv                           |
|--------------|------------------------------|------------------------------|
| Leptina      | 5'-TGAGCACCTGCTTCATGCTC-3'   | 5'-TGAGTGCGGTTTGACCACTG-3'   |
| Adiponectina | 5'-ATGGTCCTGTGATGCTTTGA-3'   | 5'-GAGAGTAAATGCACCAATAAG-3'  |
| AdipoR1      | 5'-AATTCCTGAGCGCTTCTTTCCT-3' | 5'-CATAGAAGTGGACAAAGGCTGC-3' |
| AdipoR2      | 5'-TGCAGCCATTATAGTCTCCCAG-3' | 5'-GAATGATTCCACTCAGGCCTAG-3' |
| BACT         | 5'-GCACCACACCTTCTACAAAG-3'   | 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGTC-3'  |

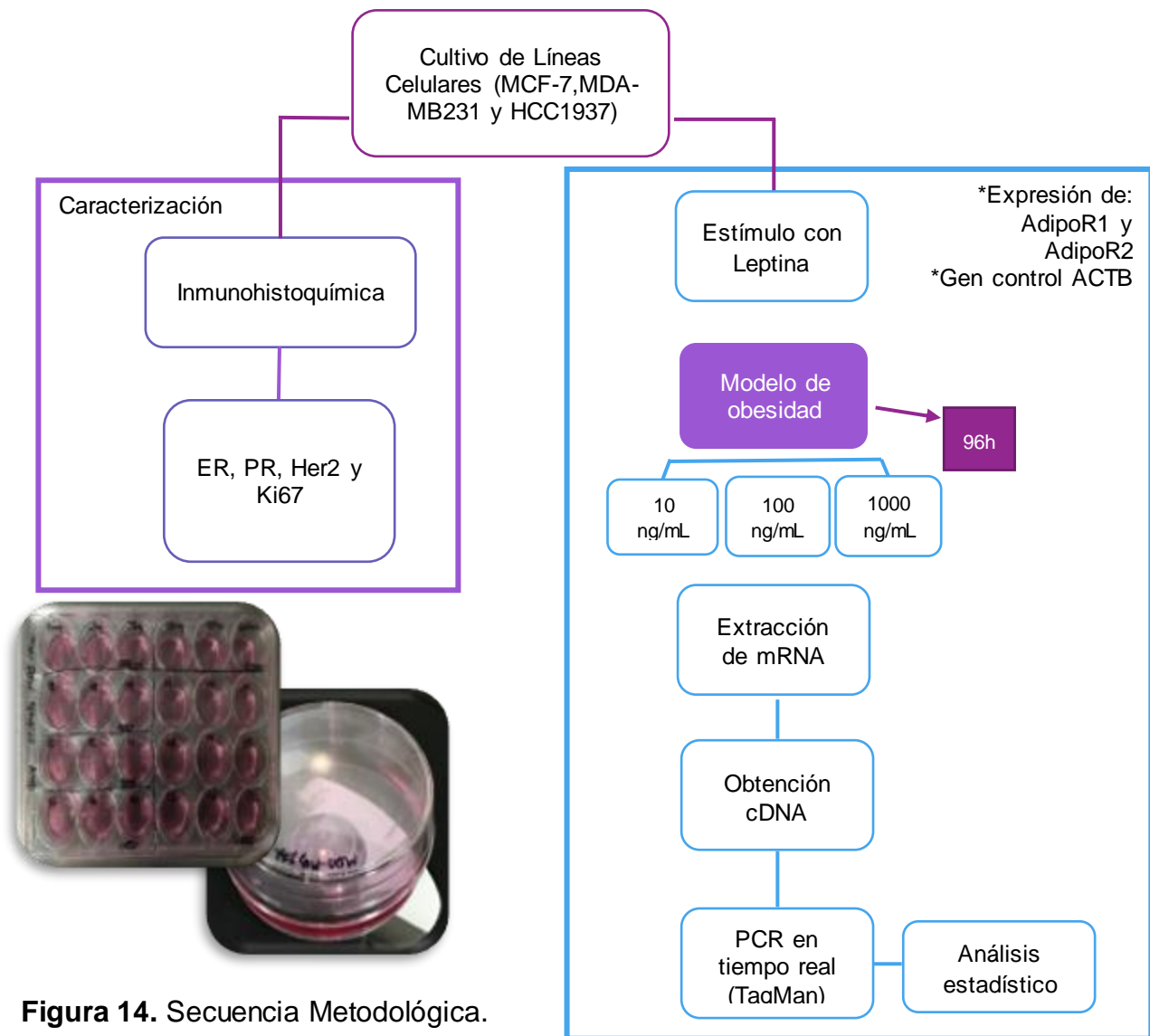
Así mismo, el cDNA obtenido se utilizó para realizar la determinación de la expresión génica de AdipoR1 y AdipoR2 por PCR en tiempo real (LightCycler® 2.0, Roche) utilizando sondas TaqMan® (Gene Expression Assays, Applied Biosystems, USA) para AdipoR1 (Hs 01114951\_m1) y AdipoR2 (Hs 00226105\_m1) usando como control el gen ACTB (Hs 99999903\_m1) en el termociclador LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics), colocando 2 µL de cDNA para cada reacción de PCR en un volumen total de 20 µL. El programa utilizado para realizar la RT-PCR fue 50°C por 2 min, 95° por 10min y 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min.

Para la determinación de los niveles relativos de expresión génica AdipoR1 y AdipoR2 se usó el método de cuantificación relativa de Pfaffl, basado en la comparación del ciclo umbral (CT) de un gen constitutivo (mRNA de ACTB) frente al gen problema de cada

muestra por duplicado. El cambio de pliegue en AdipoR1 y AdipoR2 se normalizó frente a los genes de referencia expresados constitutivamente y luego se comparó con controles no tratados como sigue:

$2^{-\Delta\Delta CT}$ , donde  $\Delta\Delta CT = \Delta\Delta CT = (C_{T\text{-problema}} - C_{T\text{-referencia}})_{\text{muestra tratada}} - (C_{T\text{-problema}} - C_{T\text{-referencia}})_{\text{muestra calibradora}}$ .

La muestra calibradora se refiere al nivel de expresión (1 x) del gen diana normalizado para el gen constitutivo. El calibrador se eligió del grupo de control de cada línea celular y se le dio un valor de expresión relativo de 1 [140 -142].



**Figura 14.** Secuencia Metodológica.



Los estudios moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Hemato-oncología del Hospital del niño del IMIEM, Toluca México.

#### **4.6 Análisis Estadístico**

Para analizar los resultados de las curvas de viabilidad de cada línea celular se realizó ANOVA de dos factores, utilizando un P valor  $> 0.05$  para establecer una relación entre el tiempo de incubación y las concentraciones de Leptina.

Para el análisis de los resultados de la expresión de AdipoR1 y AdipoR2 primero se probó la hipótesis de normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente se utilizaron la Prueba t de Student para variables paramétricas y la Prueba U de Mann-Whitney para variables no paramétricas utilizando un P valor  $> 0.05$  para cada una.

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 6.

## VI. RESULTADOS

### 5.1 Publicación del Artículo en revista *Disease Markers* de la editorial Hindawi:

“Expression of AdipoR1 and AdipoR2 receptors as Leptin-Breast cancer regulation mechanisms”

Mociño-Rodríguez Martha Daniela<sup>1</sup>: mmocinor171@alumno.uaemex.mx

Santillán-Benítez Jonnatan Guadalupe<sup>1</sup>: jonnathangsb@yahoo.com.mx

Dozal-Domínguez David Salomón<sup>3</sup>: david\_dozal@hotmail.com

Hernández-Navarro María Dolores<sup>1</sup>: mdhernandezn@uaemex.mx

Flores-Merino Miriam Veronica<sup>2</sup>: mvfloresm@uaemex.mx

Sandoval-Cabrera Antonio<sup>3</sup>: sandoval.mx@gmail.com

García Vázquez Francisco Javier<sup>4</sup>: momoxco@yahoo.com

<sup>1</sup>Faculty of Chemistry, Autonomous University of the State of Mexico (UAEMex)

<sup>2</sup> Molecular Biology Laboratory, Medical Research Center (CICMED)

<sup>3</sup> Specialized Hemato-Oncological Laboratory of the Children’s Hospital, IMIEM.

<sup>4</sup> Laboratory of Immunohistochemistry, National Pediatrics Institute.

Corresponding author: Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez, Faculty of Chemistry, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan S/N. zip code 50120, Toluca de Lerdo, State of México, México. Phone: (52) 722 2 17 41 20. e-mail: jonnathangsb@yahoo.com.mx

#### 1. Abstract

The development of breast cancer is influenced by the adipose tissue through the proteins leptin and adiponectin. However, there is little research concerning AdipoR1 and AdipoR2 receptors and the influence of leptin over them. The objective of this work was to analyze the expression of AdipoR1 and AdipoR2, modulated by differential concentrations of leptin in an obesity model (10 ng/mL, 100 ng/mL, 1000 ng/mL) associated to breast cancer in MCF-7 and HCC1937 cell lines. Each cell line was

characterized through immunohistochemistry and the expression of AdipoR1 and AdipoR2 was analyzed by PCR in real time using TaqMan® probes.

Leptin induced an increase in cell population of MCF-7 (23.8%, 10 ng/mL, 48 h) and HCC1937 (17.24%, 1000 ng/mL, 72 h). In MCF-7, the expression of AdipoR1 decreased (3.81%, 1000 ng/mL) and the expression of AdipoR2 increased by 13.74 times (10 ng/mL) with regard to the control. In HCC1937, the expression of AdipoR1 decreased by 86.28% (10 ng/mL), as well as the expression of AdipoR2 (50.3%, 100 ng/mL).

In regard to the results obtained, it could be concluded that leptin has an effect over the expression of AdipoR1 and AdipoR2 mRNA.

**Key Words:** Breast cancer, MCF-7, HCC1937, leptin, AdipoR1, AdipoR2

## 2. Introduction

Over the last 20 years, the development of breast cancer has been associated to lifestyle changes, primarily to obesity [1]. Considered an excess in the accumulation of adipose tissue produced when caloric intake exceeds energy consumption [2]. Besides storing excess calories in the form of lipids, the adipose tissue participates through diverse forms in the development of cancer due to the fact that it also acts as an endocrine gland, liberating the adipocytokines leptin, adiponectin and pro-inflammatory molecules [3].

Leptin is a protein produced from the OB gen or “gen of obesity” [4]. The expression of the gen is restricted to adipose tissue and its levels are closely related to the storage of triglycerides and the mass of adipose tissue [5]. It is a pleiotropic adipocytokine which regulates the ingestion of foods, energy consumption, immunity, inflammation, hematopoiesis, cell differentiation and proliferation [6, 7].

Adiponectin is a protein produced exclusively in white adipose tissue [8] and is considered as a protection hormone, carrying out an important role in the regulation of glucose through a potent sensitizing effect towards insulin, which affects the uptake of

glucose in muscle and participates in the homeostasis of lipids [9]. Its plasmatic concentration has an inversely-proportional relationship towards obesity, body mass index, accumulation of visceral fat and insulin resistance [10, 11]. It carries out its function through two specific receptors, AdipoR1 and AdipoR2, which are receptors coupled to G proteins with six transmembrane domains. AdipoR1 is predominantly expressed in striated muscle, while AdipoR2 is mainly expressed in the liver [12]. The bonding of adiponectin to its receptors increases the activity of the AMP (AMPK)-dependent proteinkinase and the peroxisome proliferator-activated alpha receptor (PPAR- $\alpha$ ), favoring the oxidation of fatty acids and the entrance of glucose into tissues [13]. The activated AMPK system plays a vital role in the regulation of the energetic metabolism and cell quiescence [14, 15].

The pathologies which modify the biology of adipose tissue, such as obesity, and produce an alteration in the secretion of these adipocytokines, increasing the liberation of leptin, VEGF, IL-6 and TNF- $\alpha$  and decreasing the secretion of adiponectin could be linked to different carcinogenic mechanisms including cell differentiation, apoptosis, cell proliferation, angiogenesis and alteration of steroidal sex hormone levels [9].

This variation in the secretion of adipocytokines by the adipose deposits may explain the relationship between obesity and the development of breast cancer, since obese subjects present a decrease in the levels of circulating adiponectin and increase in the plasmatic concentration of leptin [5, 16].

The aforementioned has been observed in diverse *in vitro* experiments, in which the promoting activity of proliferation in breast cancer cell lines by leptin is mediated through different signal pathways; on one hand, it acts inducing the P13K/Akt survival pathway, activating the phosphorylation of Akt, stimulating protein expression of PKC- $\alpha$ , activating the MAPK pathway, and stimulating ERK1 and ERK2 [17-20]. It activates the STAT3 pathway and induces upregulation of c-myc at an mRNA level, as well as at a protein level. Likewise, it upregulates genes of the cell cycle (cyclin D1), reduces the expression of p53 and the production of Bax [21-23]. Some studies suggest that leptin may promote angiogenesis in breast cancer through the signaling of VEGF [24]. In this manner, it can be deduced that the pro-carcinogenic effect of

leptin derives from the activation of signaling pathways implicated in the cell proliferation process and a downregulation of the apoptotic response [25. 26].

Likewise, the anti-proliferative action of breast cancer cells by adiponectin is mediated by an inactivation of protein 1 and 3 expression in MAPK p44/42, a stimulation of AMPK activity and a decrease in phosphorylation of Akt, associated with an increased expression of LKB1, reducing the activity of mTOR and a leading to a decrease in the production of reactive oxygen species [19, 27-29]. Studies suggest that adiponectin modulates the cell cycle of breast cancer cells, decreasing the expression of cyclin D1 [30, 31]. In diverse studies, it has been detected that adiponectin induces cell apoptosis when stimuli is given to cell lines with an incubation period longer than 48 h [32. 33]. Also, an increase of PPAR in estrogen-positive cell lines, the downregulation of Bcl2 and the activation of p53 and Bax, have been detected [34. 35]. Finally, it is suggested that an interaction of adiponectin and estrogen pathways exists, since it is capable of reducing aromatase and the expression of the receptor [36].

For the identification of the pro-carcinogenic mechanisms of leptin, the breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and T47D have been characterized for the protein and its receptor [Ob-R), studying its effect over cell growth in the MCF-7, SK-BR-3, T47D and ZR-75-1 cell lines. An increase in cell proliferation when the cells receive a single stimuli of leptin and are incubated between 24 and 96 h, has been observed [21, 27, 28, 37, 38].

In order to better understand the potential involvement of Leptin in the expression of Adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in cells of breast cancer, the main objective of this research was to demonstrate that AdipoR1 and AdipoR2 were expressed in MCF-7 and HCC1937 breast cancer cell lines, as well as to determine and analyze the expression of these receptors modulated by differential concentrations of Leptin. [27].

### **3. Materials and methods**

#### **3.1 Cell culture**

For this study, cell lines MCF-7 and HCC1937 were employed and were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). They were cultivated at 37° C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 85% humidity, with culture medium (RPMI 1640 medium, Gibco® Thermo Fisher Scientific™, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Caisson Labs, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®, Thermo Fisher Scientific™, USA), inactivated by heat (30 min at 57° C; water bath), with medium exchange every third day.

### **3.2 Immunohistochemistry**

The expression of estrogens (RE), progesterone (RP), Her2 and Ki67 was determined through immunohistochemistry. Once a confluence of 70% of cells was reached, they were washed with PBS (Phosphate-Buffered Saline, Gibco® Thermo Fisher Scientific™, USA) and were suspended with 0.05% trypsin (Gibco® Canada). The recuperated cells were centrifuged for 3 min at 1500 rpm and the cell pellet was then used to prepare slides fixed with acetone. Posteriorly, the recuperation of epitopes was done, utilizing 0.1% sodium citrate (Dako, USA, pH 6.2), inactivating endogenous peroxidase with 0.9% hydrogen peroxide. The slides were washed with distilled water and were placed in PBS for 5 minutes [41]. The cells were then incubated during 45 minutes with the following antibodies: RE 1:35 (Dako USA), RP 1:50 (Dako USA), Her2 1:50 (Biocare USA) and Ki67 1:100 (Biocare USA).

Next, a two-step detection system was incorporated (Mach 1 Universal HRP-Polymer Detection, Biocare USA) during 30 minutes each. The reaction was visualized with 3,3' diaminobenzidine (Leica Biosystems, USA) and was stained with Hill's hematoxylin [41].

### **3.3 Proliferation assay**

The study of cell proliferation was carried out through the crystal-violet assay. For this purpose, two groups of 5,000 MCF-7 and HCC1937 cells were inoculated in 96-well

culture plates and were left to grow during 24 h (Group 1) and 48 h (Group 2). Afterwards, each group was washed every 24 h, during 96 h, with PBS and fresh culture medium (supplemented with 5% SFB) with leptin stimuli, which was added (Recom Hu Leptin Active, Sino Biological, Thermo Fisher Scientific™, USA) in concentrations of 0 ng/mL (negative control), 10 ng/mL, 100 ng/mL and 1000 ng/mL [27]. The decrease of SFB was done to reduce the growth factors that could interfere with the action of leptin [42].

Cell proliferation in each cell line was determined in triplicate for every concentration evaluated. After 24 h of stimulation, the cells were fixed with 1.1% glutaraldehyde (Merck, Germany) during 15 minutes and then PBS was added until the 96 h of stimulation with leptin was concluded for each group. At the end of stimulation, the fixed cells were stained with crystal-violet for 15 minutes, the plate was washed with water and 10% acetic acid was placed in each well. Immediately after, the plate was read at an excitation wavelength of 490 nm and an emission wavelength of 630 nm in a microplate reader (Stat Fax 2100 Microplate Reader, Awareness Technology, Inc.)

### **3.4 Analysis of microassays**

The regulation of gene expression of adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 was evaluated by means of the addition of leptin to the cell lines following the methodology proposed by Jardé *et al.*, 2009 [27], with slight modifications. 2000 MCF-7 and HCC1937 cells were cultured in 24-well culture plates, allowing them to grow during 48 h.

After 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, the cells were washed with PBS and fresh culture medium (supplemented with 5% SFB) with leptin stimuli (0 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL and 1000 ng/mL), was added. At the end of the stimulation, the culture medium was removed and 400 µL of TRIzol® reagent was added to carry out the mRNA extraction, in accordance with the protocol of use (Ambion™).

Once the mRNA was obtained, the acquisition of the complementary DNA was carried out (cDNA) from 2 µg of mRNA through the reverse transcriptase reaction, in accordance with the protocol of use (High Capacity RNA to cDNA kit, Applied Biosystems), obtaining 20 µL of cDNA.

The cDNA of the controls of each cell line were used to determine, through endpoint PCR (HotStarTaq DNA Polymerase, QIAGEN, Germany), the presence of AdipoR1 mRNA (Fw: 5' AATTCCTGAGCGCTTCTTTCCT-3', Rv: 5'-CATAGAAGTG GACAAAGGCTGC-3') and AdipoR2 mRNA (Fw: 5'-TGCAGCCATTATAG TCTCCCAG-3', Rv: 5'-GAATGATTCCACTCAGGCCTAG-3'), using the ACTB control gen (Fw: 5'-GCACCACACCTTCTACAAAG-3', Rv: 5'GGTCTCAAACATGATCTGGTC-3').

Likewise, the cDNA obtained through the stimuli was used to determine the gene expression of AdipoR1 and AdipoR2 through real-time PCR (TaqMan Universal Mmix II, with UNG), utilizing TaqMan® probes (Gene Expression Assays, Applied Biosystems) for AdipoR1 (Hs 01114951\_ml) and AdipoR2 (Hs 00226105\_ml), using the ACTB gene as a control (Hs 99999903\_ml), following the instructions of the LightCycler® 2.0 thermocycler (Roche Diagnostics). The program utilized to carry out the PCR was 50° C for 2 minutes, 95° C for 10 min, 40 cycles at 95° C for 15 seconds and 60° C for 1 min.

For the determination of relative levels of AdipoR1 and AdipoR2 gene expression, the Pfaffl method of relative quantification, based on the comparison of the threshold cycle of a constitutive gene (mRNA of ACTB) with the test gene of each sample in duplicate, was carried out. The change in fold of AdipoR1 and AdipoR2 was normalized with regard to the reference genes expressed constitutively, and were then compared with the non-treated controls as follows:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , where  $\Delta\Delta CT = \Delta\Delta CT = (C_{T-Target} - C_{T-reference})_{treated\ sample} - (C_{T-Target} - C_{T-reference})_{calibrating\ sample}$ . "Calibrating sample" refers to the level of expression (1 x) of the target gene normalized for the constitutive gen. The



calibrator was chosen from the control group of each cell line and was given a value of 1 for relative expression [43-45].

#### **4. Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software. To analyze the results of the growth curves of each cell line, a two-factor ANOVA was performed with a P value > 0.05, to establish the relationship between incubation time and Leptin concentrations.

For the analysis of gene expression results of AdipoR1 and AdipoR2 we first tested a normality hypothesis using the Kolmogorov-Smirnov test. Subsequently, the Student's t test was performed for the parametric variables and the Mann-Whitney U-Test for the non-parametric variables with a P value > 0.05 for each one.

#### **5. Results**

##### **5.1 Characterization by immunohistochemistry**

The selection of the cell lines employed in this experiment was done in accordance with the molecular classification of breast cancer; in other words, in accordance with the hormonal receptors that are found expressed by the cells.

Using the immunohistochemistry technique, each cell line was characterized according to the molecular classification “triple positive” (MCF-7) and “triple negative” (HCC1937), evaluating the presence of Ki67, estrogens (RE), progesterone (RP) and Her2 (Figure 1).

*Insert Figure 1*

MCF-7, a cell line identified as “triple positive”, had an expression positive for Ki67 at 78% (78 cells out of 100), RE at 45% (45 cells out of 100), RP at 5% (5 cells out of 100) and Her2, with 14% (14 cells out of 100).

In contrast to MCF-7, HCC1937 breast cancer cells presented an expression negative for RE, RP and Her2. For Ki67, they presented an expression positive at 7% (7 cells out of 100), as is shown in Figure 1.

## **5.2 Expression of leptin, adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 in breast cancer cell lines**

The mRNA of leptin and adiponectin was detected in MCF-7 breast cancer cells through endpoint PCR, observing a greater expression of leptin mRNA when compared to adiponectin mRNA, in accordance with the bands obtained in the electrophoretic gel, as shown in Figure 2. With regard to HCC1937, a triple-negative cell line with a mutation in BRCA1 [46], it was also possible to determine the expression of these genes (Figure 2).

*Insert Figure 2*

As far as AdipoR1 and AdipoR2 mRNA is concerned, it was detected in MCF-7 and HCC1937 cells through endpoint PCR. In MCF-7, two adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 receptors were found to be expressed, just as Jardé *et al.* had reported [27]. As in the case of leptin and adiponectin, HCC1937 expresses these two receptors, a line that was not found to be reported “positive” in literature (Figure 3).

*Insert Figure 3*

In both cell lines, the expression of AdipoR2 mRNA is greater with regard to BACT and AdipoR1 mRNA expression, in agreement with the bands obtained in the electrophoretic gel, as can be seen in Figure 3.

Once it was proven that the three cell lines studied express AdipoR1 and AdipoR2 mRNA, the quantitative determination of the expression of these receptors through real-time PCR, utilizing BACT as a control, went underway.

### **5.3 Effect of leptin over cell proliferation of MCF-7 and HCC1937 breast cancer cells**

In the cells which were subjected to the leptin stimuli 24 h after culture (Group 1), a negative effect was observed (anti-proliferative) in cell proliferation with relation to leptin concentrations. With regard to MCF-7 cells, the cell population decreased 64.71% (1000 ng/mL, 96 h), except at 1000 ng/mL, where it increased 30.77% after 72 h of stimulation. The cell growth of HCC1937 decreased at all concentrations, up to 57.14% (1000 ng/mL, 24 h) (Figure 4).

*Insert Figure 4*

In relation to the cells that were subjected to the leptin stimuli 48 h after culture (Group 2), a positive effect was observed in cell proliferation with relation to leptin concentrations. With regard to MCF-7, the effect of this protein over cell proliferation was positive, increasing by 28.57% (10 ng/mL, 48 h); this effect was maintained until 72 h, at a concentration of 1000 ng/mL, where there was an 3.45% increase with regard to the control. It was observed that for the concentration that corresponds to normal weight (10 ng/mL), the positive effect of leptin was maintained until 48 h and decreased by 6.90% with the third stimuli (72 h), and posteriorly presented an increase in the cell population once again at 96 h; not so for the concentration of 100 ng/mL, where at 72 h of stimulation, the cell population decreased by 26.68%. The cell growth of HCC1937 decreased by 23.46% (1000 ng/mL, 24 h), except after 72 h, at which all the concentrations presented an increase in the cell population, up to 17.24% (1000 ng/mL), maintaining themselves until 96 h, where there was an increase of 0.49% at 10 ng/mL, 0.25% at 100 ng/mL and 10.31% at 1000 ng/mL with regard to the control, indicating that the higher the concentration of leptin, the higher the increase in cell

population. It was observed that, despite the fact that the cell population was maintained above the control at all times and concentrations after 48 h of stimulation, there was a gradual decrease of cells, as can be seen in Figure 4.

#### **5.4 Expression of AdipoR1 and AdipoR2 mediated by leptin in breast cancer cell lines**

The mRNA of AdipoR1 and AdipoR2 was detected in MCF-7 and HCC1937 cell lines through real-time PCR. The expression of AdipoR1 and AdipoR2 in mRNA was determined in cells that were stimulated with leptin at differential concentrations (0 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL and 1000 ng/mL) in both cell lines.

In MCF-7, the expression of AdipoR1 had a decrease of 3.81% (1000 ng/mL) in the cells treated with leptin with regard to the control, except for 100 ng/mL, where there was a 64.03% increase in the expression of the gene. However, the expression of AdipoR2 increased considerably in the cells treated with leptin (up to 13.74 times; 10 ng/mL), with regard to the control (Figure 5).

*Insert Figure 5*

Analyzing the normalized values of treated cells in the MCF-7 line, no statistically-significant differences were found in the expression of AdipoR1 between the controls and the cells treated with differential concentrations of leptin: 10 ng/mL ( $p = 0.0945$ ), 100 ng/mL ( $p = 0.760$ ) and 1000 ng/mL ( $p = 0.7840$ ). However, upon analyzing the normalized values of treated cells for the expression of AdipoR2, statistically-significant differences were found between the controls and the cells treated with differential concentrations of leptin: 10 ng/mL ( $p = 0.0022$ ), 100 ng/mL ( $p = 0.0022$ ) and 1000 ng/mL ( $p = 0.0022$ ) (Table 1).

In HCC1937, the expression of AdipoR1 decreased in cells treated with leptin with regard to the control, as much as 86.28% (10 ng/mL), while the expression of AdipoR2 had a decrease in the cells treated with leptin with regard to the control, as much as 50.3% (100 ng/mL), which can be seen in Figure 5.

Analyzing the normalized values of treated cells in the HCC1937 line, statistically-significant differences were found with regard to the controls for the expression of AdipoR1 in the cells treated: 10 ng/mL ( $p = 0.0043$ ) and 1000 ng/mL ( $p = 0.0130$ ). For the cells treated with 100 ng/mL of leptin, no statistically-significant differences were found for the expression of AdipoR1. As for the expression of AdipoR2, upon analyzing the normalized values of treated cells, no statistically-significant differences were found between the controls and the cells treated with differential concentrations of leptin: 10 ng/mL, 100 ng/mL and 1000 ng/mL (Table 1).

*Insert Table 1*

## **6. Discussion**

It has been determined that obesity and excess weight are a risk factor for the development of breast cancer in women (occidental and Asian) [47, 48]. The pro-carcinogenic effect of leptin and the anticarcinogenic effect of adiponectin is mainly due to two mechanisms: 1) modulation of signaling pathways implicated in the proliferation process and 2) subtle regulation of the apoptotic response [4].

The characterization of each cell line through the immunohistochemistry technique was carried out according to the molecular classification “triple negative” (MCF-7) and “triple negative” (HCC1937), which allowed for the observation that in MCF-7, the estrogen receptor presented an expression 9 times greater than the progesterone receptor and up to 3.21 times greater than Her2. HCC1937 presented a negative expression for ER, PR and Her2, which corresponds to that reported in literature [49], in addition to the 7% Ki67 expression.

The effect of leptin over cell growth has been determined in MCF-7, MDA-MB231, SK-BR-3, T47D and ZR-75-1 breast cancer cell lines, mediated by diverse signaling pathways when a single stimuli of the protein is applied and is incubated between 24 and 96 h [21, 27, 37, 38, 50, 51]. In this study, protein stimuli was applied every 24 h in order to emulate the constant secretion of said protein by adipose tissue in a condition of normal weight (10 ng/mL), excess weight-obesity (100 ng/mL) and a very high concentration of leptin (1000 ng/mL).

In Group 1 of the MCF-7 breast cancer cells, it was observed that the effect of leptin over cell proliferation was anti-proliferative, decreasing up to 64.71%. It was also observed that this anti-proliferative effect is due to the sensibility of the cells while being re-cultured (period of cellular adaptation) and to the immediate administration of an exogenous agent, since despite that there was a decrease in the cell population during the first stimulation with leptin (24 h), in the posterior stimulations (48 and 72 h), there was a gradual increase in cell population with regard to the population obtained at 24 h of stimulation. For the concentration of 10 ng/mL at 48 h, an increase of 0.65% and at 72 h, of 9.50%; for 100 ng/mL at 48 h, an increase of 12.04% and at 72 h, of 69.23%; for 1000 ng/mL at 48 h, an increase of 12.04% and at 72 h, of 139.74%, were observed, which indicate that the greater the concentration of leptin, the greater the increase in cell population. Likewise, the cells to which 4 stimuli of leptin were administered (96 h) showed a major decrease in cell population with regard to the control (10 ng/mL: 45.09%; 100 ng/mL: 56.86%; 1000 ng/mL: 64.71%), possibly due to a saturation of the cell receptors by leptin.

In the MCF-7 breast cancer cells of Group 2, the effect of leptin over cell proliferation was positive, increasing up to 28.57%, except for the concentration of 100 ng/mL, in which at 72 h of stimulation, the cell population decreased up to 26.68% (10 ng/mL, 48 h) and was maintained until 72 h at the concentration of 1000 ng/mL, where there was a 3.45% increase with regard to the control. This effect could be due to the elimination of the cellular adaptation period, since the cells were left to grow for another

24 h before the addition of exogenous agent (leptin) to the medium, allowing the cells to grow stronger, so as to not be damaged by the protein.

In the HCC1937 breast cancer cells of Group 1, the effect of leptin over cell proliferation was negative at all concentrations evaluated (57.14%). As in the case of the MCF-7 breast cancer cells, it was observed that this anti-proliferative effect is due to the sensibility of the cells while being re-cultured and the immediate administration of leptin, since despite a decrease in the cell population during the first stimulation with leptin (24 h), in the second, there was a small increase in the population with regard to the cells obtained at 24 h of stimulation: for the concentration of 10 ng/mL, an increase of 60%; for 100 ng/mL, an increase of 40% and for 1000 ng/mL, an increase of 28.33%. However, this effect was not maintained with posterior stimulations.

The aforementioned results demonstrate that the period of cellular adaptation interferes with the effect of leptin over MCF-7 and HCC1937 proliferation, in which the period of cellular adaptation posterior to culture is between 2-3 days. In these cell lines, there was a positive effect over cell proliferation at all concentrations administered, when the first stimuli was administered 48 h after cell culture. Based on these results, it was decided that a cell stimulation be done with leptin 48 hours after cell culture.

An important find from the detection of leptin, adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNA in breast cancer cells through endpoint PCR was that in HCC1937, a triple-negative cell line with a mutation in BRCA1 [46], these proteins and receptors are also found to be expressed, information that had not been reported in literature. The aforementioned means that, indistinctly of the molecular classification of breast cancer to which the cell lines belong, they can express leptin, adiponectin and its receptors, allowing for the possibility of a future treatment for triple-positive breast cancer patients, patients with negative breast cancer and patients with triple-negative breast cancer with mutations in BRCA1.

As for the expression assay, in MCF-7 breast cancer cells, the expression of mRNA of AdipoR2 ( $2.423 \pm 2.35$ ) was greater than the expression of AdipoR1 ( $1.679 \pm 1.76$ ). For the stimulations with leptin, it was found that the expression of AdipoR1 mRNA decreased with regard to the control in the cells that received 100 ng/mL and 1000 ng/mL of up to 3.81%, while the cells that received a stimuli of 10 ng/mL showed a 64.03% increase in expression. Surprisingly, the expression of AdipoR2 mRNA was dramatically increased at all concentrations of leptin: 10 ng/mL (13.75 times), 100 ng/mL (9.23 times) and 1000 ng/mL (11.39 times). Once again, at the concentration at which there was a greater increase in the expression of the adiponectin receptor was at the “normal weight” concentration (10 ng/mL), which could indicate that in a condition of normal weight (10 ng/mL), at a high level of AdipoR1 and AdipoR2, the adiponectin could successfully carry out its anti-proliferative activity of cancer cells and, in this manner, generate a form of protection for the patient.

The reduction in the expression of AdipoR1 in MCF-7 breast cancer cells correspond with that proposed in the hypothesis of the present work, since in cells that received higher concentrations of leptin (100 ng/mL = excess weight-obesity; 1000 ng/mL), a decrease in the expression of mRNA of the gen was observed with regard to the control, while the cells that received stimulation with a concentration corresponding to normal weight showed an increase in the expression of both receptors. On the other hand, the increase in the expression of AdipoR2 mRNA and the decrease in the cell population at all concentrations at 96 h of stimulation, could indicate that the effective receptor for the *in vivo* signaling of adiponectin in the breast cancer tissue is AdipoR2; this corresponds to that found in 2009 by Jardé et al. [27].

Despite this evidence, the notion of the effective receptor for Adiponectin is uncertain, since it has been found that when siRNA was used against AdipoR1, the anti-proliferative activity of adiponectin in T47D cells was annulated [30]. Likewise, studies have established a relationship between the presence of AdipoR1 and a better diagnosis in gastric and colon cancers [52. 53].



With regard to the expression of AdipoR1 and AdipoR2 mRNA in HCC1937 breast cancer cells, as in the case of MCF-7 cells, the expression of AdipoR2 mRNA ( $1.336 \pm 0.905$ ) was greater than the expression of AdipoR1 ( $1.181 \pm 0.67$ ). However, contrary to that found in MCF-7, there was a decrease in the expression of AdipoR1 mRNA of up to 86.26% (10 ng/mL), when stimulated with leptin, and up to 50.3% (100 ng/mL) for the expression of AdipoR2 mRNA. These results correspond to that found in cell viability curves (Fig. 4), where it can be seen in a much more marked manner, that there is a positive stimulation over cell proliferation at all concentrations of leptin employed due to the lack of anti-proliferative activity offered by adiponectin through its receptors, generated from the decrease in the mRNA expression of these.

For HCC1937 cells, a part of the hypothesis proposed was corroborated for AdipoR1 and AdipoR2, due to the fact that there was a decrease in the expression of mRNA in both cell receptors in the cells that received stimulation from leptin every 24 h. Contrary to that expected, a greater decrease of expression was found in concentrations corresponding to normal weight (10 ng/mL) and excess weight-obesity (100 ng/mL), which could indicate that in a condition of excess weight and obesity, there is a blockage in the expression of these receptors, which leads to adiponectin not being able to carry out its protective (antiproliferative) action during the development of breast cancer.

In our study one of the limitations found was that the effect of Leptin on cell proliferation and expression of AdipoR1 and AdipoR2 was modest, due to the range of Leptin concentrations used to perform the cellular stimulus was very wide, which did not allow to identify exactly the effect that this protein has on the gene expression of these receptors in a state of obesity. On the other hand, it is impossible to extrapolate the results obtained from Leptin stimulation in the cell lines with the results of expression that could be obtained directly from obese patients with breast cancer due to the complexity of the metabolic environment of the tumor *in vivo*.

## **7. Conclusion**

In this study, the effect of leptin over cell proliferation and genic expression of AdipoR1 and AdipoR2 in MCF-7 and HCC1937 cells was modest. Indistinctly of the molecular classification of breast cancer of the cell lines used, they all express leptin, adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2. It was determined that the period of cell adaptation generates an interference with the effect of leptin over the proliferation of MCF-7 and HCC1937 cells. During the development of breast cancer, the capacity of proliferation (23.68% for MCF-7 and 17.24% for HCC1937), explained by the deregulation of leptin in obesity, could be very relevant at the moment of prescribing a treatment to the patient. The concentration of leptin that generated an increase in the expression of both receptors of adiponectin was that corresponding to normal weight (10 ng/mL), indicating that in said condition, adiponectin can successfully carry out its anti-proliferative activity over cancer cells and, in this manner, generate a form of protection for the patient.

The reduction in the expression of AdipoR1 mRNA and the increase in the expression of AdipoR2 mRNA could indicate that the effective receptor for the *in vivo* signaling of adiponectin in breast cancer tissue is AdipoR1.

## **8. Declaration of conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **9. Acknowledgements**

This work was supported by the Autonomous University of the State of Mexico and the IMIEM Specialized Hemato-oncological Laboratory.

## **10. References**

1. Jardé T., Caldefie-Chézet F., Damez M, Mishellany F., Penault-Llorca F., Guillot J., Vasson M.P. (2008). Leptin and leptin receptor involvement in cancer

- development: A study on human primary breast carcinoma. *Oncology Reports*. 19. 905-911.
2. Morimoto L. M., White E., Chen Z., Chlebowski R. T., Hays J., Kuller L., Lopez A.M., Manson J., Margolis K.L, Muti P.C, Stefanick M.L., McTiernan A. (2002). Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes and Control* 13. 741–751.
  3. Khandekar M. J., Cohen P., Spiegelman B.M. (2011). Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews*, (11). 886-895.
  4. Jardé T., Perrier S., Vasson M.P., Caldefie-Chézet F. (2011). Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *European Journal of Cancer*. 33-43.
  5. Ruhl C.E., Everhart J.E. (2001). Leptin concentrations in the United States: relations with demographic and anthropometric measures. *Am J Clin Nutr*.74:295-301.
  6. Moon H. S., Dalamaga M., Kim S. Y., Polyzos S. A., Hamnvik O. P., Magkos F., Paruthi J., Mantzoros C. S. (2013). Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin resistant and diabetic individuals. *Endocr Rev*. 34: 377-412.
  7. Dalamaga M., Chou S. H., Shields K., Papageorgiou P., Polyzos S. A., Mantzoros C. S. (2013). Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab*. 18: 29-42.
  8. Housa D., Housová J., Vernerová Z., Haluzík M. (2006). Adipocytokines and Cancer. *Physiological Research*. 55: 233-244.
  9. Delort L., Jardé T., Dubois V., Vasson M. P., Caldefie-Chézet F. (2012). New Insights into Anticarcinogenic Properties of Adiponectin: A Potential Therapeutic Approach in Breast Cancer?. *Vitamins and Hormones*, 397-417.
  10. Matsuzawa Y., Funahashi T., Kihara S., Shimomura I. (2004). Adiponectin and Metabolic Syndrome. *Vasc Biol*. 24:29-33.
  11. López Fontana C. M., Maselli Artola M. E., Di Milta Mónaco N., Recalde Rincón G. M., Vanrell Rodriguez M. C., Uvilla Recupero A., Messina Lombino D., Pérez

- Elizalde R. F., López Laur J. D. (2009). Influencia de la Leptina y la Adiponectina sobre el cáncer de próstata. *Arch. Esp. Urol.* 62 (2): 103-108.
12. Thundyil J., Pavlovski D., Sobey C. G., Arumugam T.V. (2011). Adiponectin receptor signalling in the brain. *British Journal of Pharmacology.* 165: 313–327.
13. Lee Mi-Hye, Klein R. L., El-Shewy H. M., Luttrell D. K., Luttrell L. M. (2008). The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. NIH Public Access, *Biochemistry.* 47(44): 11682–11692.
14. Chandran M., Phillips S. A., Ciaraldi T., Henry R. R. (2003). Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 26:2442–2450.
15. Fujimoto A., Akifusa S., Kamio N., Hirofujii T., Nonaka K., Yamashita Y. (2010). Involvement of mTOR in globular adiponectin-induced generation of reactive oxygen species. *Free Radic Res* 44: 128–134.
16. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 257(1):79–83.
17. Fusco R., Galgani M., Procaccini C., et al. (2010). Cellular and molecular crosstalk between leptin receptor and estrogen receptor-  $\alpha$  in breast cancer: molecular basis for a novel therapeutic setting. *Endocr Relat Cancer.* 17(2):373–82.
18. Frankenberry K. A., Skinner H., Somasundar P., McFadden D. W., Vona-Davis L. C. (2006). Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer. *Int J Oncol.* 28(4):985–93.
19. Nkhata K. J., Ray A., Schuster T. F., Grossmann M. E., Cleary M. P. (2009) Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth. *Oncol Rep.* 21(6):1611–9.
20. Garofalo C., Sisci D., Surmacz E. (2004) Leptin interferes with the effects of the antiestrogen ICI 182, 780 in MCF-7 breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 10(19):6466–75.
21. Yin N., Wang D., Zhang H., Yi X., Sun X., Shi B., Wu H., Wu G., Wang X., Shang Y. (2004). Molecular Mechanisms Involved in the Growth Stimulation of Breast Cancer Cells by Leptin. *Cancer Research.* 64:5870-5875.

22. Santillán Benítez J. G., Ordoñez A., Mendieta Zerón H., Gómez Oliván L. M. (2012). La Leptina en la carcinogénesis mamaria. Vías de señalización. *Química Viva*, 2(11). 91-111.
23. Okumura M., Yamamoto M., Sakuma H., et al. (2002). Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC- $\alpha$  and PPAR expression. *Biochim Biophys Acta*. 1592(2):107–16.
24. Gonzalez R. R., Cherfils S., Escobar M., et al. (2006). Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). *J Biol Chem*. 281(36):26320–8.
25. Binai N. A., Damert A., Carra G., et al. (2010). Expression of estrogen receptor alpha increases leptin-induced STAT3 activity in breast cancer cells. *Int J Cancer*. 127(1):55–66.
26. Chen C., Chang Y. C., Liu C. L., Chang K. J., Guo I. C. (2006) Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and downregulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1. *Breast Cancer Res Treat*. 98(2):121–32.
27. Jarde T., Caldefie-Chezet F., Goncalves-Mendes N., et al. (2009). Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocr Relat Cancer*. 16(4):1197–210.
28. Dieudonne M. N., Bussiere M., Dos Santos E., et al. (2006). Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 345(1):271–9.
29. Taliaferro-Smith L., Nagalingam A., Zhong D., et al. (2009). LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 28(29):2621–33.
30. Nakayama S., Miyoshi Y., Ishihara H., Noguchi S. (2007). Growth inhibitory effect of adiponectin via adiponectin receptor 1 on human breast cancer cells through inhibition of S-phase entry without inducing apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 112(3):405–10.

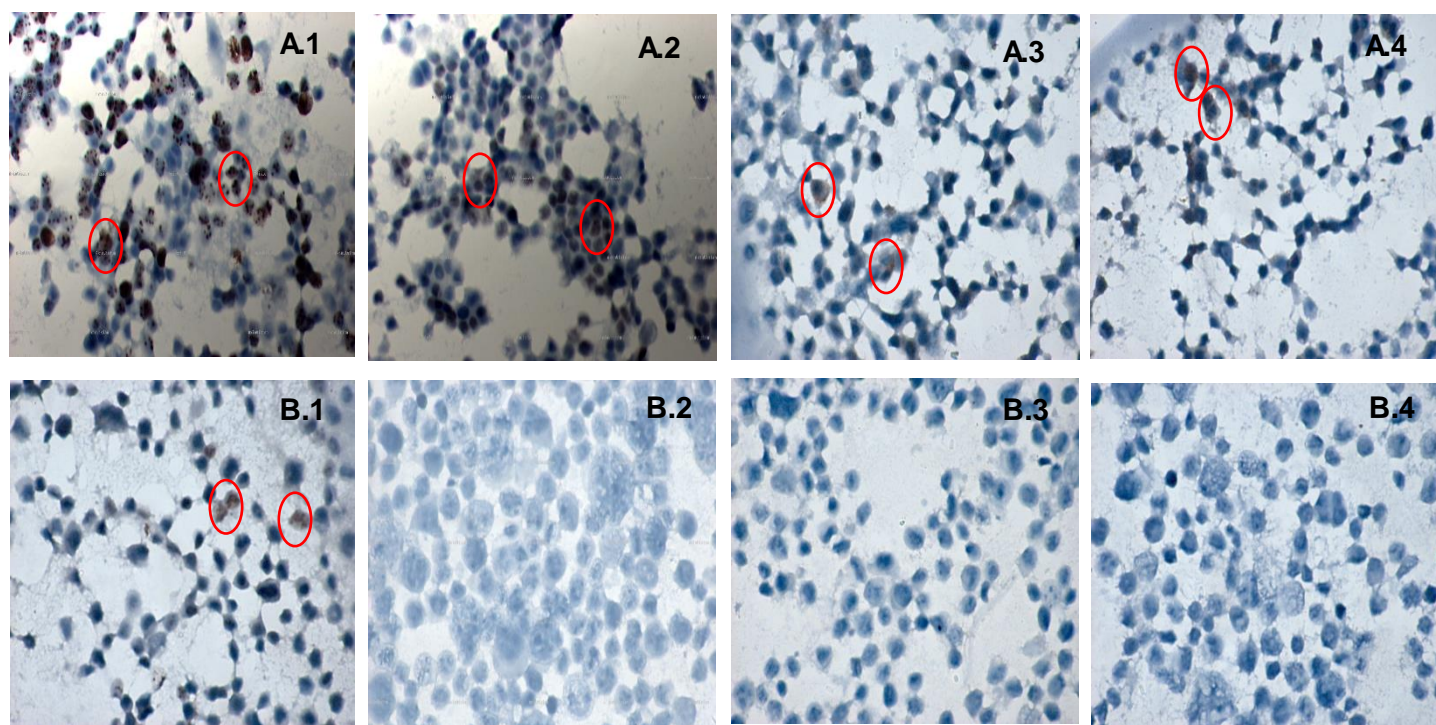
31. Wang Y., Lam J. B., Lam K. S., et al. (2006) Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDAMB-231 cells in nude mice. *Cancer Res.* 66(23):11462–70.
32. Kang J. H., Lee Y. Y., Yu B. Y., et al. (2005). Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Arch Pharm Res.* 28(11):1263–9.
33. Korner A., Pazaitou-Panayiotou K., Kelesidis T., et al. (2007). Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and *in vivo* studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3):1041–8.
34. Grossmann M.E., Nkhata K. J., Mizuno N. K., Ray A., Cleary M. P. (2008). Effects of adiponectin on breast cancer cell growth and signaling. *British Journal of Cancer.* 98: 370 – 379.
35. Dos Santos E., Benaitreau D., Dieudonne M. N., et al. (2008) Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 20(4):971–7.
36. Treeck O., Lattrich C., Juhasz-Boess I., et al. (2008). Adiponectin differentially affects gene expression in human mammary epithelial and breast cancer cells. *Brit J Cancer.* 99(8):1246–50.
37. Soma D., Kitayama J., Yamashita H., et al. (2008). Leptin augments proliferation of breast cancer cells via transactivation of HER2. *J Surg Res.* 149(1):9–14.
38. Somasundar P., Yu A. K., Vona-Davis L., McFadden D. W. (2003). Differential effects of leptin on cancer in vitro. *J Surg Res.* 113(1):50–5.
39. Takahata C., Miyoshi Y., Irahara N., et al. (2007). Demonstration of adiponectin receptors 1 and 2 mRNA expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 250(2):229–36.
40. Arditi J. D., Venihaki M., Karalis K. P., Chrousos G. P. (2007). Antiproliferative effect of adiponectin on MCF7 breast cancer cells: a potential hormonal link between obesity and cancer. *Horm Metab Res.* 39(1):9–13.
41. García Vázquez F. J., Farfán Morales J. E. (2014). *Manual Técnicas de Herramientas en Patología, Vol. 1. Inmunohistoquímica.*

42. Dubois V., Delort L., Billard H., Vasson M.P., Caldefie-Chezet F. (2013). Breast Cancer and Obesity: In Vitro Interferences between Adipokines and Proangiogenic Features and/or Antitumor Therapies? PLOS ONE. 3(8). e58541
43. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25, 402–408.
44. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2003–2007.
45. Schmittgen, T.D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1100–1108.
46. Tomlinson G. E., Chen T. T., Stasny V. A., Virmani A. K., Spillman M. A., Tonk V., Blum J. L., Schneider N. R., et al. (1998). Characterization of a breast cancer cell line derived from a germline BRCA1 mutation carrier. *Cancer Res.* 58: 3237–3242.
47. Lorincz A. M., Sukumar S. (2006). Molecular links between obesity and breast cáncer. *Endocrine-Related Cancer.* 13: 279–292.
48. Chlebowski R. T., Aiello E., McTiernan A. (2002). Weight loss in breast cancer patient management. *J Clin Oncol.* 20(4): 1128–43.
49. Gazdar A. F., Kurvari V., Virmani A., Gollahon L., Sakaguchi M., Westerfield M., Kodagoda D., Stasny V., Cunningham H. T., et al. (1998). Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer.* 78, 766–774
50. Dieudonne M. N., Machinal-Quelin F., Serazin-Leroy V., et al. (2002). Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 293(1):622–8.
51. Naviglio S., Di Gesto D., Sorrentino A., et al. (2009). Leptin enhances growth inhibition by cAMP elevating agents through apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 8(12):1183–1190.
52. Tsukada T., Fushida S., Harada S., Terai S., Yagi Y., Kinoshita J., Oyama K. et al. (2011). Adiponectin receptor-1 expression is associated with good prognosis in gastric cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 30:107.

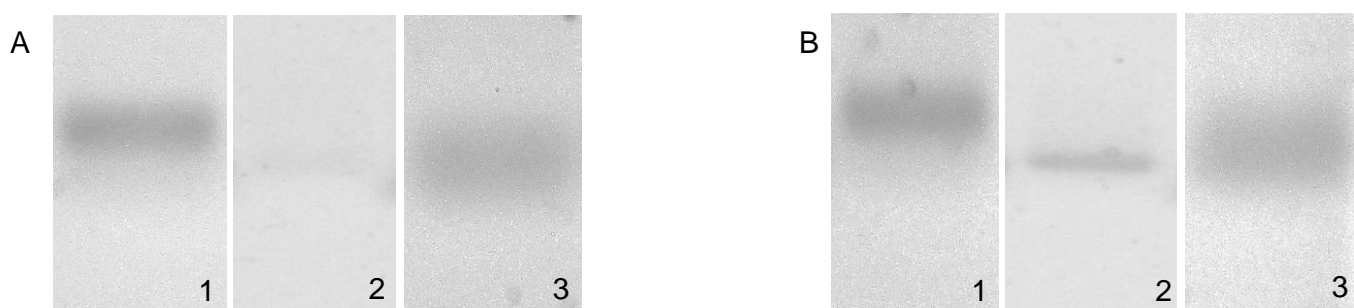


53. Kim A. Y., Lee Y. S., Kim K. H, Lee J. H., Lee H. K., Jang S. H., Kim S. E., Lee G. Y., et al. (2010). Adiponectin Represses Colon Cancer Cell Proliferation via AdipoR1- and -R2-Mediated AMPK Activation. *Mol Endocrinol.* 24(7):1441–1452.

## Figures

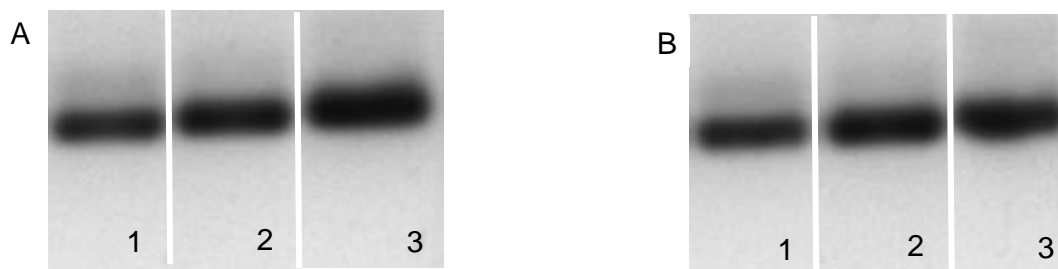


**Figure 1.** Characterization through immunohistochemistry, of MCF-7 and HCC1937 cells. Detection through immunohistochemistry of the Ki67 protein, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and Her2 in breast cancer cell lines. MCF-7 expression positive for Ki67 (A.1), ER (A.2), PR (A.3) and Her2 (A.4). HCC1937 cells exhibited an expression positive for Ki67 (B.1), while they showed an expression negative for ER (B.2), PR (B.3) and Her2 (B.4).

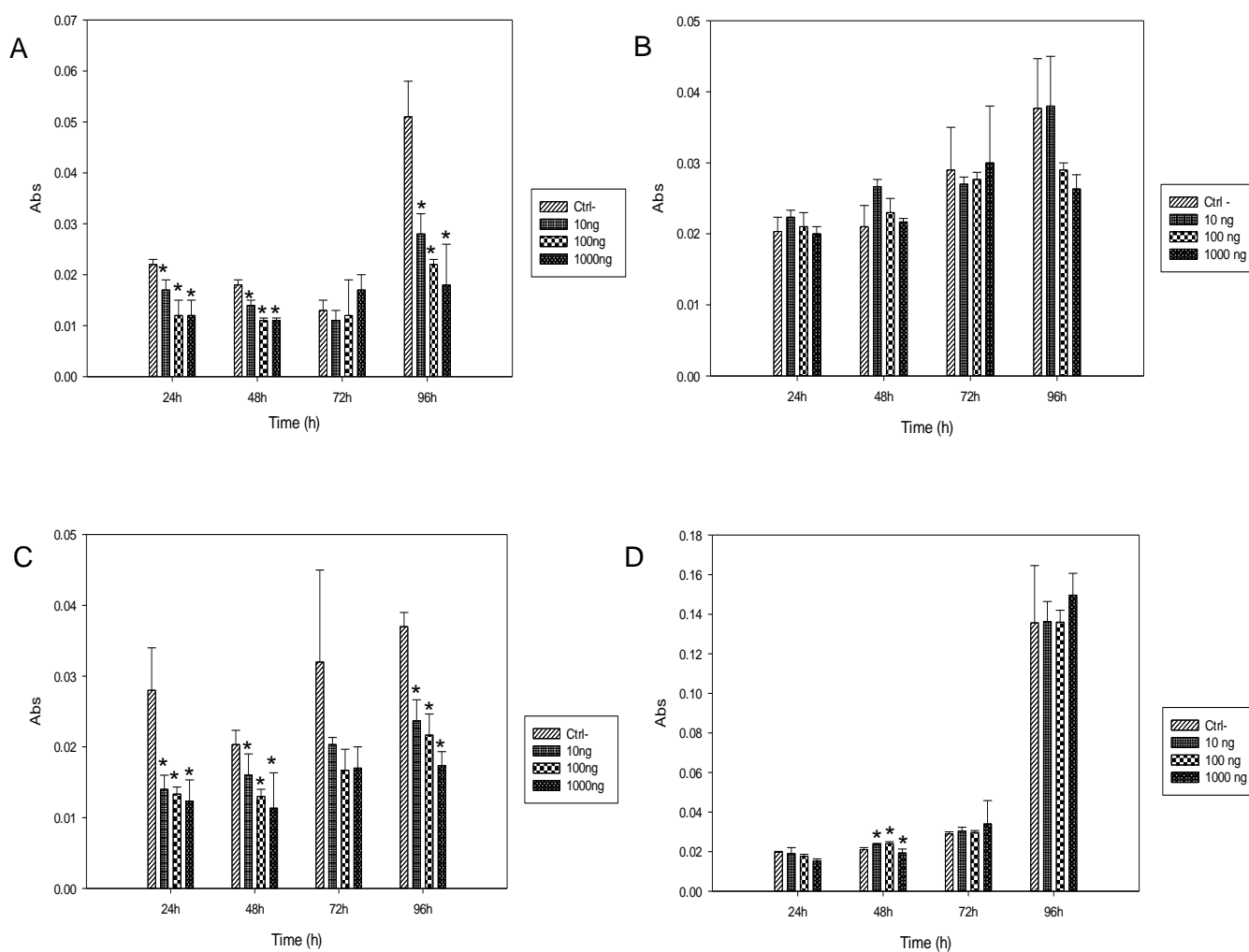


**Figure 2.** Detection of the expression of ABL control gene mRNA (1), adiponectin (2) and leptin (3) through endpoint PCR in MCF-7 (A) and HCC1937 (B) cells.

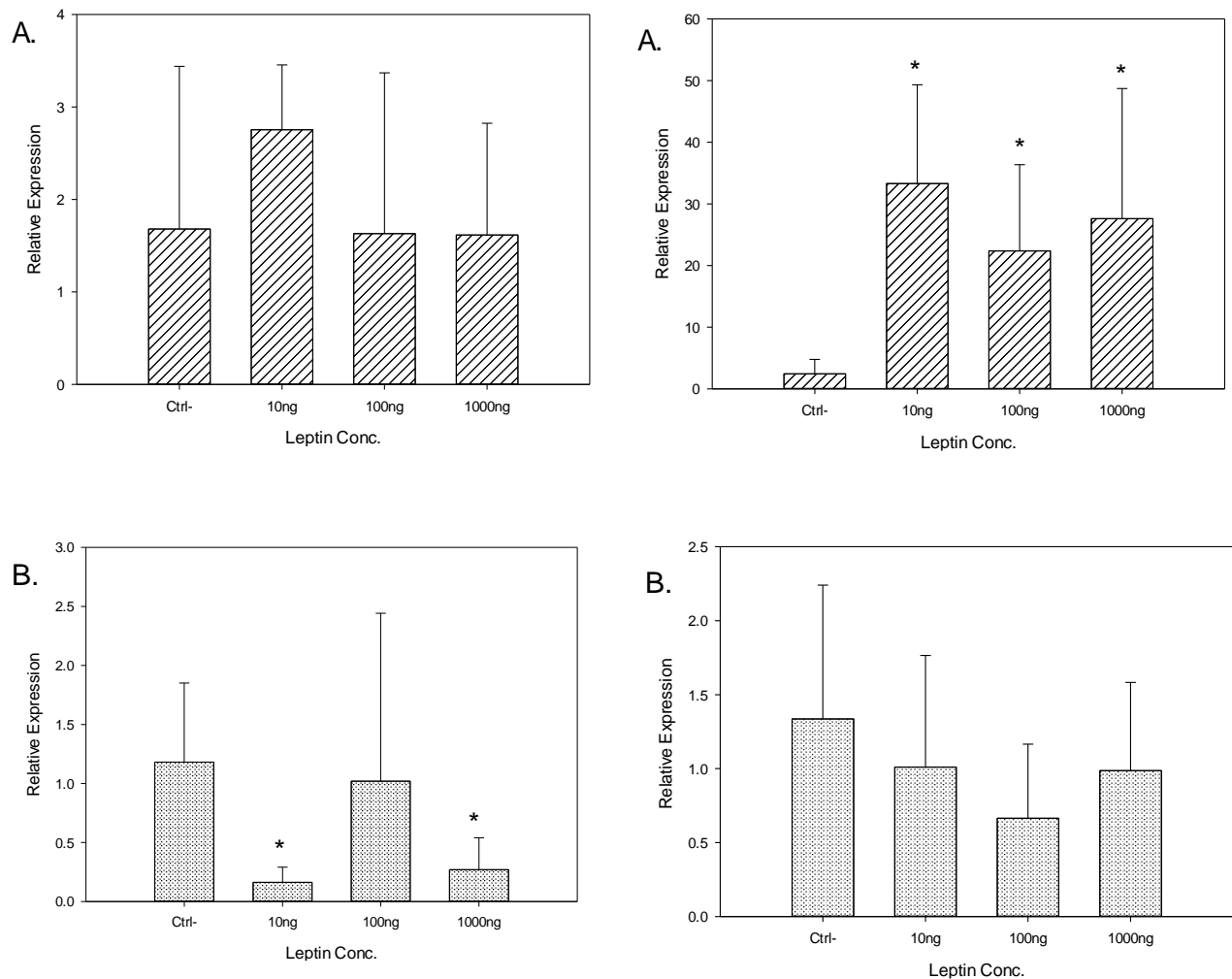




**Figure 3.** Detection of ACTB mRNA expression (1), AdipoR1 (2) and AdipoR2 (3) through endpoint PCR in MCF-7 (A) and HCC1937 cells (B).



**Figure 4.** Cell viability with leptin stimulation. The data is expressed in mean  $\pm$  SD, n = 3. Effect of leptin in MCF-7 breast cancer cells (A) at application of the first stimuli 24 h after cell culture, (B) MCF-7 cells at application of first stimuli 48 h after cell culture, (C) HCC1937 cells at application of first stimuli 24 h after cell culture and (D) HCC1937 cells at application of first stimuli 48 hours after cell culture. \*Significant differences compared with the control (ANOVA test, P<0.05).



**Figure 5.** Units of relative expression of AdipoR1 and AdipoR2. The data is expressed as mean  $\pm$  SD. In MCF-7 breast cancer cells, there is a 2.92% decrease in the expression of AdipoR1 (A.1) in cells treated with leptin (100 ng/mL) with regard to the control, and of 3.81% for the concentration of 1000 ng/mL, except at 10 ng/mL where there was a 64.03% increase, however no significant differences were found in any of the concentrations relative to control; the expression of AdipoR2 (A.2) increased by 13.74 times in cells treated with leptin (10 ng/mL) with regard to the control, 9.23 times for 100 ng/mL and 11.39 times for 1000 ng/mL, finding significant differences compared to the control in all concentrations. With regard to the HCC1937 breast cancer cells the expression of AdipoR1 (B.1) presented an 86.28% decrease in cells treated with leptin (10 ng/mL) with regard to the control, 13.72% (100 ng/mL) and 77.14% (1000 ng/mL), finding significant differences for 10 g/mL and 1000 ng/mL; the expression of AdipoR2 (B.2) exhibited a 24.4% decrease in cells treated with leptin (10 ng/mL), with regard to the control, 50.3% (100 ng/mL) and 26.2% (1000 ng/mL), however no significant differences were found in any of the concentrations relative to control. \*Significant differences compared to the control (U of Mann-Whitney,  $P \leq 0.05$ ).

**Table 1. Relative expression of AdipoR1 and AdipoR2**

| Cell Line      | Leptin Concentration (ng/mL) | $2^{-\Delta\Delta CT}$ AdipoR1 | $2^{-\Delta\Delta CT}$ AdipoR2 |
|----------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>MCF-7</b>   | 10                           | 2.754 ± 0.701                  | 33.31 ± 16.006**               |
|                | 100                          | 1.63 ± 1.74                    | 22.354 ± 14.006**              |
|                | 1000                         | 1.615 ± 1.209                  | 27.607 ± 21.102**              |
| <b>HCC1937</b> | 10                           | 0.162 ± 0.129**                | 1.01 ± 0.755                   |
|                | 100                          | 1.019 ± 1.423                  | 0.664 ± 0.502                  |
|                | 1000                         | 0.27 ± 0.27*                   | 0.986 ± 0.597                  |

$2^{-\Delta\Delta CT}$  Relative expression using BACT as a constitutive gene. The data is expressed as mean ± SD, n = 6. In statistical U Mann Whitney test, significance with regard to the control  $P \leq 0.05^*$ ,  $P \leq 0.01^{**}$ .

## 5.2 Otros resultados y Discusión

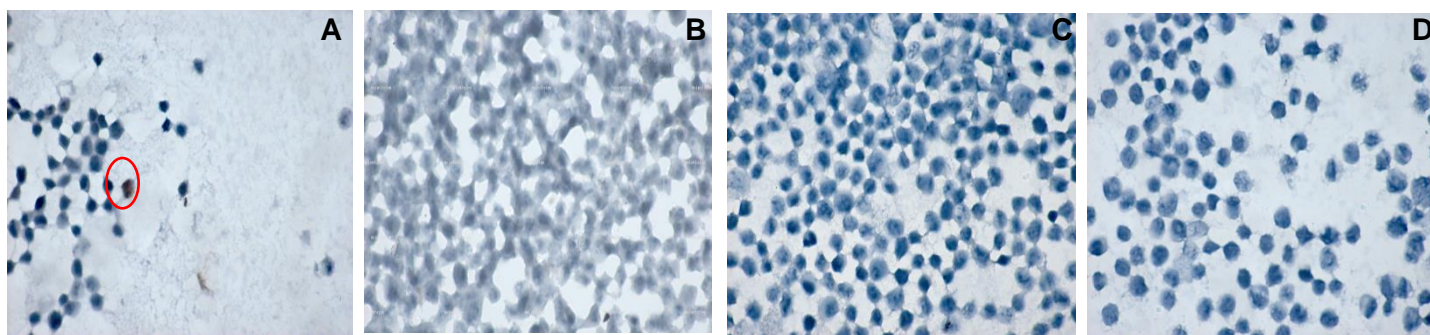
En el presente trabajo también se estudió a la línea celular MDA-MB231 y los efectos de la Leptina sobre la proliferación celular y sobre la expresión de los receptores de Adiponectina en esta línea celular.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- **Caracterización por Inmunohistoquímica de MDA-MB231.**

La elección de las líneas celulares empleadas en este experimento se realizó de acuerdo a la clasificación molecular de cáncer de mama, es decir, de acuerdo a los receptores hormonales que se encuentran expresados por las células.

Usando la técnica de Inmunohistoquímica se caracterizó a cada línea celular de acuerdo a la clasificación molecular triple negativa (MDA-MB231), evaluando la presencia de Ki67, Estrógenos (RE), Progesterona (RP) y Her2.



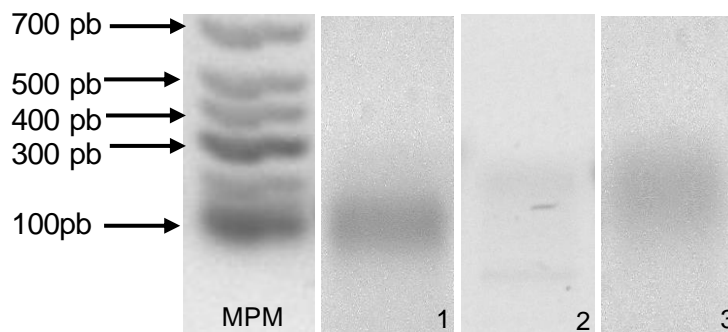
**Figura 15.** Detección por Inmunohistoquímica de la proteína de Ki 67 (A), receptor de estrógenos (B), receptor de progesterona (C) y Her2 (D) en MDA-MB231.

En la Figura 15 podemos observar que MDA-MB 231 presentó una expresión negativa para RE, RP y Her2, como está reportado en la literatura, mientras que para Ki67 presentó una expresión positiva en un 6.6% (4 células de 60) al teñirse de café la células que expresan la proteína. Sorprendentemente, al contrario de lo que encontraron Subik

*et al.*, (2010) la expresión de Ki67 en MDA-MB231 (6.6%) fue muy poca en comparación a otras líneas celulares como MCF-7. Una explicación de la dramática diferencia entre los resultados obtenidos para Ki67 en MDA-MB231 y lo reportado en la literatura es debido a que el periodo de adaptación de la línea celular es muy corto y por lo tanto alcanzar una confluencia del 70% muy rápido, por lo que las células se cosecharon durante la fase de crecimiento lo que no permitió la expresión de la proteína en la totalidad de las células [145].

- **Expresión de Leptina, Adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2 en MDA-MB231.**

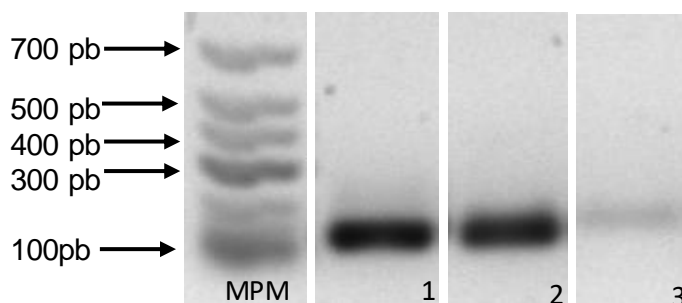
El mRNA de Leptina y Adiponectina fue detectado en MDA-MB231 por medio de PCR en punto final. Estos resultados corresponden a lo reportado en la literatura y se pueden observar en la Figura 16, donde en el gel de electroforesis se obtuvieron fragmentos de 100 pares de bases correspondientes al fragmento amplificado en la PCR en punto final con los oligos utilizados para Adiponectina y Leptina [131].



**Figura 16.** Detección de expresión de mRNA del gen control ABL (1), Adiponectina (2) y Leptina (3) por medio de PCR en punto final en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231.

En cuanto al mRNA de AdipoR1 y AdipoR2 también fue detectado en esta línea celular por medio de PCR en punto final. En la Figura 12 se puede observar en el gel de electroforesis fragmentos de 97 pares de bases correspondientes al fragmento

amplificado en la PCR en punto final con los oligos utilizados para AdipoR1 y de 100 pares de bases correspondientes al fragmento amplificado para AdipoR2.

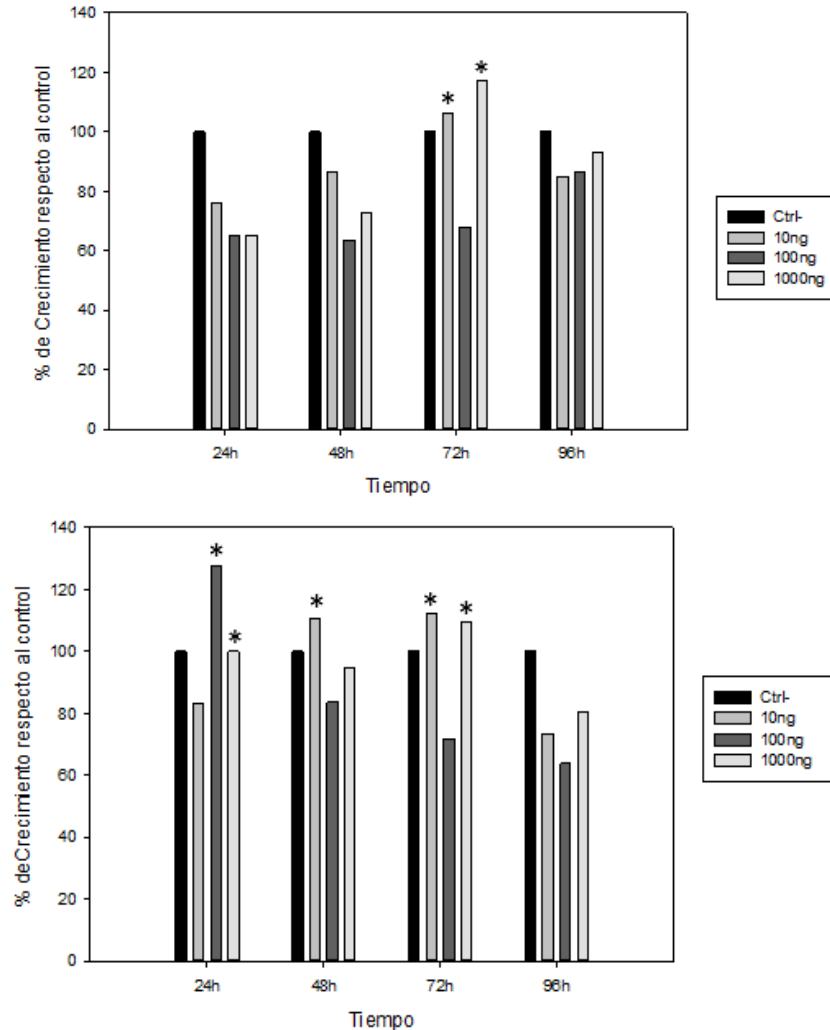


**Figura 17.** Detección de expresión de mRNA de ACTB (1), AdipoR1 (2) y AdipoR2 (3) por medio de PCR en punto final en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231.

Se pudo observar que aunque el mRNA de AdipoR2 si está expresado por esta línea celular, la expresión de este gen es muy pequeña respecto al gen constitutivo utilizado (BACT) de acuerdo a la nitidez de las bandas obtenidas en el gel de electroforesis apreciadas en la Figura 17.

- **Efecto de Leptina sobre la proliferación celular de MDA-MB31.**

En el Grupo 1 de las células de cáncer de mama MDA-MB231, se determinó que el efecto de esta proteína sobre la proliferación celular fue positivo aumentando hasta en un 27.78% con 100 ng/mL a las 24 h, manteniendo este efecto positivo hasta las 72 h en la concentración de 10 ng/mL y 1000 ng/mL con un aumento respecto al control del 12.50% y 9.38% respectivamente. Nuevamente se observó que en la concentración de normo- peso de 10 ng/mL, el efecto positivo de la Leptina se mantenía más tiempo (hasta las 72 h) que en comparación con las otras concentraciones. La concentración donde se observó una mayor disminución de la población celular respecto al control fue la de sobrepeso-obesidad (100 ng/mL) donde hubo una disminución del 31.11% a las 96 h de estímulo, a pesar de que fue la concentración donde hubo mayor aumento de la población celular al inicio de los estímulos, como se puede observar en la Figura 18.



**Figura 18.** Porcentaje de crecimiento celular con estímulo de Leptina en células de cáncer de mama MDA-MB231. Efecto de la Leptina en células de cáncer de mama (A) MDA-MB231 al aplicarse el primer estímulo 24h después de la siembra, (B) al aplicarse el primer estímulo 48h después de la siembra. \*Diferencias significativas comparado contra el control (prueba ANOVA,  $P < 0.05$ ).

Para el Grupo 2 de las células de cáncer de mama MDA-MB231 el efecto de esta proteína sobre la proliferación celular fue negativo, disminuyendo a lo largo de todos los estímulos hasta en un 36.36% (100 ng/mL, 48 h), excepto a las 72 h en 10 ng/mL y 1000 ng/mL donde hubo un aumento del 6.38% y 17.02% respectivamente, lo que indica que entre mayor sea la concentración de Leptina mayor es el aumento en la población celular como se puede observar en la Figura 18.

- **Expresión de AdipoR1 y AdipoR2 mediada por Leptina en MDA-MB231:**

En MDA-MB231 la expresión del mRNA de AdipoR1 y AdipoR2 no se pudo debido a que los genes estudiados no amplificaron con el programa utilizado, ocasionado posiblemente por mutaciones del gen en las zonas de reconocimiento por las sondas TaqMan®, ya que se comprobó la calidad de las muestras y en ninguna de las repeticiones experimentales se obtuvo amplificación de los genes estudiados.



## VII. CONCLUSIONES

- Indistintamente de la clasificación molecular de cáncer de mama de las líneas celulares utilizadas, éstas expresan el mRNA de Leptina, Adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2.
- Se determinó que el periodo de adaptación celular si genera una interferencia con el efecto de la Leptina sobre la proliferación de MCF-7 y HCC1937, teniendo un efecto positivo sobre la proliferación celular cuando el primer estímulo se administraba 48 h posteriores a la siembra
- En MDA-MB231 se observó un aumento de la proliferación celular cuando el primer estímulo de Leptina se administraba 24 h posteriores a la siembra, no afectando el periodo de adaptación celular.
- Tanto en MCF-7 y en HCC1937 la expresión de mRNA de AdipoR2 fue mayor a la expresión de AdipoR1.
- Durante el desarrollo de cáncer de mama, la capacidad de proliferación ligeramente elevada explicada por la desregulación de la secreción de Leptina en la obesidad es muy relevante al momento de indicar un tratamiento al paciente, debido a que la concentración de Leptina que generó un aumento de la expresión de ambos receptores de Adiponectina fue en la concentración de normo-peso (10 ng/mL). Lo anterior indica que en un estado de peso normal la Adiponectina podría llevar a cabo exitosamente su actividad anti-proliferativa de las células de cáncer y por ende generar una protección en el paciente.
- La reducción de la expresión de AdipoR1 y el aumento en la expresión del mRNA de AdipoR2, así como la disminución de la población celular a 96 h de estímulo en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, indica que el receptor efectivo para la señalización *in vivo* de Adiponectina en el tejido de cáncer de mama es AdipoR2.

## VIII. REFERENCIAS

1. Jardé T, Caldefie-Chézet F, Damez M, et al. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: A study on human primary breast carcinoma. *Oncol Rep.* 2008; 19, 905-911.
2. Morimoto L M, White E, Chen Z, et al. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes and Control.* 2002; 13, 741–751.
3. Khandekar M J, Cohen P, Spiegelman B M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11, 886-895.
4. Delort L, Jardé T, Dubois V, et al. New insights into anticarcinogenic properties of adiponectin: a potential therapeutic approach in breast cancer? In Gerald Litwack, editor: *Vitamins and Hormones.* Burlington: Academic Press. 2012; 90: 397-417.
5. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257(1):79–83.
6. Ruhl C E & Everhart J E. Leptin concentrations in the United States: relations with demographic and anthropometric measures. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74(3):295–301.
7. Torres Vidales G & Eslava Mocha P R. Tumores mamarios en caninos: Adenocarcinoma complejo de glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. *Orinoquia.* 2007; 11(1), 99-110.
8. Moore K L & Agur A M R. *Fundamentos de anatomía: con orientación clínica.* Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana. 2003.
9. Latarjet M & Ruiz Liard A. *Anatomía Humana.* Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana. 2005: 2.
10. Instituto Nacional del Cáncer. Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU: *Diccionario del cáncer.* EE.UU. 2016. Recuperado de:  
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=415575>.

11. Diario Oficial, Secretaria de Salud. 2011. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. México.
12. American Cancer Society. Cáncer de seno (mama). 2014.
13. Weigelt B, Geyer F C, Reis-Filho J S. Histological Types of breast cancer: How special are they? *Mol Onc.* 2010; 4(3):192-208.
14. Asociación Española Contra el Cáncer. Cáncer de mama. Madrid, España. AECC. 2014.
15. McPherson K, Steel C M, Dixon J M. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000; 321(7261): 624-628.
16. Weigelt B & Reis-Filho J S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6:718-730.
17. Romero-Utrilla A, Osuna-Ramos J F, Candanedo-Gonzalez F, et al. Cáncer de Mama: Entidad Patológica de Biología Heterogénea. *Arch Salud Sin.* 2014; 8(3): 109-116.
18. Chanjes V, Torres-Mejía G, Biessy C, et al.  $\nu$ -3 and  $\nu$ -6 Polyunsaturated Fatty Acid Intakes and the Risk of Breast Cancer in Mexican Women: Impact of Obesity Status. *AACR.* 2011; 21(2), 319-326.
19. Fundación Contra el Cáncer. Cáncer de mama: una guía para pacientes. European Society for Medical Oncology. 2013.
20. Siziopikou K P. Ductal carcinoma *in situ* of the breast: current concepts and future directions. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137(4):462-466.
21. Malhotra G K, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2010; 10(10):955-960.
22. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann of Oncol.* 2012; 10(10):207-210.
23. Huicochea Castellanos S, González Balboa P, Tovar Calderón I L, et al. Cáncer de mama. *Anales de Radiología México.* 2009; 1: 117-126.
24. Santillán Benítez J G, Ordoñez A, Mendieta Zerón H, Gómez Oliván L M. La Leptina en la carcinogénesis mamaria. Vías de señalización. *Química Viva.* 2012; 2(11): 91-111.

25. Cárdenas Sánchez J, Bargalló Rocha E, Erazo Valle A, et al. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. México, Ciudad de México. Masson Doyma México S.A. 2013.
26. American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. Clasificación TNM. AJCC Cancer Staging Manual. 2002; 13-16.
27. Breastcancer.org. Estadios del cáncer de mama. EE. UU. 2015. Recuperado de <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estadios>
28. Rouzier R, Perou C M, Symmans W F, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clin Cancer Res. 2005; 11(16):5678– 5685.
29. Blows F M, Driver K E, Schmidt M K, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. PLoS Med. 2010; 7(5), e1000279.
30. De Ruijter T C, Veeck J, De Hoon J P, et al. Characteristics of triple-negative breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2011; 137(2):183-192.
31. Perou C M, Sorlie T, Eisen M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2002; 406 (6797): 747- 752.
32. Van't Veer L J, Dai H, Van De Vijver M J, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature. 2002; 415(6871):530-536.
33. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci. 2003; 100(14):8418– 8423.
34. Sotiriou C., Neo S. Y., McShane L. M., et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci. 2003; 100(18):10393-10398.
35. Vuong D, Simpson P, Green B, et al. Molecular classification of breast cancer. Virchow Arch. 2014; 465(1):1-14.
36. Arrechea Irigoyen M A, Vicente García F, Córdoba Iturriagagoitia A, et al. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. Anales Sis San Navarra. 2011; 34(2):219-233.

37. Hu Z, Fan C, Oh D S, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006; 7:96.
38. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010; 28(20):3271–3277.
39. Voduc K D, Cheang M C, Tyldesley S, et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010; 28(10):1684–1691.
40. De Ronde J J, Hannemann J, Halfwerk H, et al. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 119(1):119–126.
41. Carey L A, Dees E C, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(8); 2329–2334.
42. Glück S, Ross J S, Royce M, et al. TP53 genomics predict higher clinical and pathologic tumor response in operable early-stage breast cancer treated with docetaxel-capecitabine ± trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 132(3): 781–791.
43. Pollack J R, Perou C M, Alizadeh A A, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999; 23(1):41–46.
44. Carey L A, Perou C M, Livasy C A, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006; 295(21):2492–2502.
45. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008; 123(1):236–240.
46. Bayraktar S & Glück S. Molecularly targeted therapies for metastatic triplenegative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 138(1):21–35.
47. Prat A, Parker J S, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(5):R68.
48. Nahta R. Molecular mechanisms of trastuzumab-based treatment in her2-overexpressing breast cancer. *ISRN Oncology*. 2012:428062.

49. Lavasani M A & Moinfar F. Molecular classification of breast cancer with particular emphasis on “basal like” carcinoma: a critical review. *J Biophotonics*. 2014; 5(4):345-66.
50. Yersal O & Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014; 5(3):412-424.
51. Fukumura D, Incio J, Shankaraiah R, Jain R K. Obesity and cancer: an angiogenic and inflammatory link. *Microcirculation*. 2016; (23), 191–206.
52. Khandekar M J, Cohen P & Spiegelman B M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 886-895.
53. Lorincz A M & Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13: 279–292.
54. Wu Y, Zhang D, Kang S. Physical activity and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 137:869-882.
55. Hursting S D. Minireview: the year in obesity and cancer. *Mol Endocrinol*. 2012; 26(12):1961–1966.
56. Dalamaga M, Diakopoulos K N, Mantzoros C S. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev*. 2012; 33: 547-594.
57. Dalamaga M. Obesity, insulin resistance, adipocytokines and breast cancer: New biomarkers and attractive therapeutic targets. *World J Exp Med*. 2013; 3(3): 34-42.
58. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372: 425 – 432.
59. Moon H S, Dalamaga M, Kim S Y, et al. Leptin’s role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin resistant and diabetic individuals. *Endocr Rev*. 2013; 34: 377-412.
60. Dalamaga M, Chou S H, Shields K, et al. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab*. 2013; 18: 29-42.
61. Jardé T, Perrier S, Vasson M P, Caldefie-Chézet F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *EJC*. 2011; 33-43.
62. Chan J L, Bullen J, Stoyneva V, et al. Recombinant methionyl human leptin administration to achieve high physiologic or pharmacologic leptin levels does not

- alter circulating inflammatory marker levels in humans with leptin sufficiency or excess. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(3):1618–24.
63. Chan J L, Moschos S J, Bullen J, et al. Recombinant methionyl human leptin administration activates signal transducer and activator of transcription 3 signaling in peripheral blood mononuclear cells *in vivo* and regulates soluble tumor necrosis factor-alpha receptor levels in humans with relative leptin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(3):1625–31.
64. Ruhl C E & Everhart J E. Leptin concentrations in the United States: relations with demographic and anthropometric measures. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74:295-301.
65. Tam J, Fukumura D, Jain R K. A mathematical model of murine metabolic regulation by leptin: energy balance and defense of a stable body weight. *Cell Metab* 2009; 9: 52–63.
66. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros C S. Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Ann Intern Med.* 2010; 152(2): 93–100.
67. Considine R V, Sinha M K, Heiman M L , et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New J Engl Med.* 1996; 334: 292 – 295.
68. Frederich R C, Lollmann B, Hamann A, et al. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents: impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1659 – 1663.
69. Fruhbeck G, Aguado M, Martinez J A. *In vitro* lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes; evidence for a possible autocrine-paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240: 590 – 594.
70. Maffei M, Fei H, Lee G-H, et al. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92: 6957 – 6960.
71. Margetic S, Gazzola C, Pegg G G, Hill R A. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes.* 2002; 26, 1407–1433.

72. Bates S H, Stearns W H, Dundon T A, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*. 2003; 421(6925):856–9.
73. Niswender K D, Morton G J, Stearns W H, et al. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*. 2001; 413(6858):794–5.
74. Sader S, Nian M, Liu P. Leptin, a novel link between obesity, diabetes, cardiovascular risk, and ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003; 108:644-646.
75. Allison M B & Myers M G. Connecting leptin signaling to biological function. *J Endocrinol*. 2014; 223(1): T25–T35.
76. Myers M G, Cowley M A, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2008; 70:537-556.
77. Munzberg H. Differential leptin access into the brain--a hierarchical organization of hypothalamic leptin target sites?. *Physiol Behav*. 2008; 94(5):664–9.
78. Yin N, Wang D, Zhang H, et al. Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin. *Cancer Res*. 2004; 64:5870-5875.
79. Zheng Q, Dunlap S M, Zhu J, et al. Leptin deficiency suppresses MMTVWnt-1 mammary tumor growth in obese mice and abrogates tumor initiating cell survival. *Endocr Relat Cancer*. 2011; 18: 491-503.
80. Barb D, Williams C J, Neuwirth A K, Mantzoros C S. Adiponectin in relation to malignancies: A review of existing basic research and clinical evidence. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86, s858–s866.
81. Fabian C J. Adiponectin: a risk biomarker and attractive target for chemoprevention. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 124-126.
82. Housa D, Housová J, Vernerová Z, Haluzík M. Adipocytokines and cancer. *Physiol Res*. 2006; 55: 233-244.
83. Ziemke F, Mantzoros C S. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91: 258S-261S.
84. López Fontana C M, Maselli Artola M E, Di Milta Mónaco N, et al. Influencia de la leptina y la adiponectina sobre el cáncer de próstata. *Arch. Esp. Urol*. 2009; 62 (2): 103-108.



85. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Vasc Biol.* 2004; 24:29-33.
86. Daniele A, Cammarata R, Masullo M, et al. Analysis of adiponectin gene and comparison of its expression in two different pig breeds. *Obesity.* 2008; 16 (8): 1869–1874.
87. Kadowaki T & Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005; 26 (3): 439–451.
88. Ge H, Xiong Y, Lemon B, et al. Generation of novel longacting globular adiponectin molecules. *JMB.* 2010; 399(1):113–119.
89. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, et al. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocr.* 2005; 146(2): 790–796.
90. Almer G, Saba-Lepek M, Haj-Yahya S, et al. Globular domain of adiponectin: promising target molecule for detection of atherosclerotic lesions. *Biologics.* 2011; 5: 95–105.
91. Wen J P, Liu C E, Hu Y T, et al. Globular adiponectin regulates energy homeostasis through AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase (AMPK/ACC) pathway in the hypothalamus. *Mol Cell Biochem.* 2010; 344 (1-2): 109–115.
92. De Rosa A, Monaco M L, Capasso M, et al. Adiponectin oligomers as potential indicators of adipose tissue improvement in obese subjects. *Eur J Endocrinol.* 2013.169 (1): 37–43.
93. Wu X, Motoshima H, Mahadev K, et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes.* 2003; 52(6): 1355–1363.
94. Rao J R, Keating D J, Chen C, Parkington H C. Adiponectin increases insulin content and cell proliferation in MIN6 cells via PPAR $\gamma$ -dependent and PPAR $\gamma$ -independent mechanisms. *Diabetes Obes Metab.* 2012; 14(11): 983–989.
95. Wijesekara N, Krishnamurthy M, Bhattacharjee A, et al. Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(44): 33623– 33631.

96. Wedellova Z, Dietrich J, Siklov M, et al. Adiponectin inhibits spontaneous and catecholamine-induced lipolysis in human adipocytes of non-obese subjects through AMPK-dependent mechanisms. *Physiol Res*. 2011; 60 (1): 139–148.
97. Thundyil J, Pavlovski D, Sobey C G, Arumugam T V. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol*. 2011; 165: 313–327.
98. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423, 762–769.
99. Lee M-H, Klein R L, El-Shewy H M, et al. The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. *Biochem*. 2008; 47(44): 11682–11692.
100. Chandran M, Phillips S A, Ciaraldi T, Henry R R. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*. 2003; 26:2442–2450.
101. Fujimoto A, Akifusa S, Kamio N, et al. Involvement of mTOR in globular adiponectin-induced generation of reactive oxygen species. *Free Radic Res*. 2010; 44: 128–134.
102. Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R., et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101(8): 2476–2481.
103. Dieudonne M N, Bussiere M, Dos Santos E, et al. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 345: 271–279.
104. Grossmann M E, Nkhata K J, Mizuno N K, et al. Effects of adiponectin on breast cancer cell growth and signaling. *Br J Cancer*. 2008; 98: 370 – 379.
105. Rahal O M & Simmen R C. Paracrine-acting adiponectin promotes mammary epithelial differentiation and synergizes with genistein to enhance transcriptional response to estrogen receptor beta signaling. *Endoc*. 2011. 152: 3409–3421.
106. Tsukada T, Fushida S, Harada S, et al. Adiponectin receptor-1 expression is associated with good prognosis in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30:107.

107. Levenson A S, Jordan V C, Lurie R H. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1997; 57(15):3071-3078.
108. ATCC. MCF7 (ATCC® HTB-22™). 2016. Recuperado de: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>.
109. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974; 53: 661-674.
110. Martínez-Carpio P A, Mur C, Rosel P, Navarro M A. Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures. *Cell Signal.* 1999; 11(10): 753-757.
111. ATCC. MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). 2016. Recuperado de: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>.
112. ATCC. HCC1937 (ATCC® CRL-2336™). 2016. Recuperado de: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2336.aspx>.
113. Gazdar A F, Kurvari V, Virmani A, et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer.* 1998; 78, 766–774.
114. Jarde T, Caldefie-Chezet F, Goncalves-Mendes N, et al. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocr Relat Cancer.* 2009; 16(4):1197–210.
115. Dieudonne MN, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, et al. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 293(1):622–8.
116. Soma D, Kitayama J, Yamashita H, et al. Leptin augments proliferation of breast cancer cells via transactivation of HER2. *J Surg Res.* 2008; 149(1):9–14.
117. Somasundar P, Yu A K, Vona-Davis L, McFadden D W. Differential effects of leptin on cancer in vitro. *J Surg Res.* 2003; 113(1):50–5.
118. Catalano S, Mauro L, Bonofiglio D, et al. *In vivo* and *in vitro* evidence that PPAR $\gamma$  ligands are antagonists of leptin signaling in breast cancer. *Am J Pathol.* 2011; 179: 1030-1040.

119. Ray A. Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. *J Biosci.* 2012; 37: 289-294.
120. Frankenberry K A, Skinner H, Somasundar P, et al. Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer. *Int J Oncol.* 2006; 28(4):985–93.
121. Nkhata K J, Ray A, Schuster T F, Grossmann M E, Cleary M P. Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth. *Oncol Rep.* 2009; 21(6):1611–9.
122. Garofalo C, Sisci D, Surmacz E. Leptin interferes with the effects of the antiestrogen ICI 182, 780 in MCF-7 breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(19):6466–75.
123. Okumura M, Yamamoto M, Sakuma H, et al. Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC-alpha and PPAR expression. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1592(2):107–16.
124. Fusco R, Galgani M, Procaccini C, et al. Cellular and molecular crosstalk between leptin receptor and estrogen receptor- {alpha} in breast cancer: molecular basis for a novel therapeutic setting. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(2):373–82.
125. Binai N A, Damert A, Carra G, et al. Expression of estrogen receptor alpha increases leptin-induced STAT3 activity in breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2010; 127(1):55–66.
126. Chen C, Chang Y C, Liu C L, et al. Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and downregulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1. *Breast Cancer Res Treat.* 2006; 98(2):121–32.
127. Gonzalez R R, Cherfils S, Escobar M, et al. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). *J Biol Chem.* 2006; 281(36):26320–8.
128. Perera C N, Chin H G, Duru N, Camarillo I G. Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression. *J Endocrino I.* 2008; 199(2):221–33.

129. Takahata C, Miyoshi Y, Irahara N, et al. Demonstration of adiponectin receptors 1 and 2 mRNA expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2007; 250(2):229–36.
130. Nakayama S, Miyoshi Y, Ishihara H, Noguchi S. Growthinhibitory effect of adiponectin via adiponectin receptor 1 on human breast cancer cells through inhibition of S-phase entry without inducing apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 112(3):405–10.
131. Dos Santos E, Benaitreau D, Dieudonne M N, et al. Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2008; 20(4):971–7.
132. Wang Y, Lam J B, Lam K S, et al. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDAMB-231 cells in nude mice. *Cancer Res.* 2006; 66(23):11462–70.
133. Arditi J D, Venihaki M, Karalis K P, Chrousos G P. Antiproliferative effect of adiponectin on MCF7 breast cancer cells: a potential hormonal link between obesity and cancer. *Horm Metab Res.* 2007; 39(1):9–13.
134. Kang J H, Lee Y Y, Yu B Y, et al. Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Arch Pharm Res.* 2005; 28(11):1263–9.
135. Taliaferro-Smith L, Nagalingam A, Zhong D, et al. LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene.* 2009; 28(29):2621–33.
136. Korner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, et al. Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Clin Endocrinol Metab;* 2007; 92(3):1041–8.
137. Treeck O, Lattrich C, Juhasz-Boess I, et al. Adiponectin differentially affects gene expression in human mammary epithelial and breast cancer cells. *Brit J Cancer.* 2008; 99(8):1246–50.
138. García Vázquez F J & Farfán Morales J E. Manual Técnicas de Herramientas en Patología, Vol. 1. Inmunohistoquímica. 2014.

139. Dubois V, Delort L, Billard H, et al. Breast cancer and obesity: in vitro interferences between adipokines and proangiogenic features and/or antitumor therapies?. PLOS ONE. 2013; 3(8). e58541
140. Livak K J & Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. Methods. 2001;25, 402–408.
141. Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29, 2003–2007.
142. Schmittgen T D & Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat. Protoc. 2008; 3, 1100–1108.
143. Tomlinson G E, Chen T T, Stasny V A, et al. Characterization of a breast cancer cell line derived from a germline BRCA1 mutation carrier. Cancer Res. 1998; 58: 3237–3242.
144. Chlebowski R T, Aiello E, McTiernan A. Weight loss in breast cancer patient management. J Clin Oncol. 2002; 20(4): 1128–43.
145. Subik K, Lee J-F, Baxter L, et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. Breast Cancer (Auckl). 2010; 4, 35–41.
146. Gazdar A F, Kurvari V, Virmani A, et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. Int. J. Cancer. 1998; 78, 766–774.
147. Naviglio S, Di Gesto D, Sorrentino A, et al. Leptin enhances growth inhibition by cAMP elevating agents through apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. Cancer Biol Ther. 2009; 8(12):1183–1190.
148. Tsukada T, Fushida S, Harada S, et al. Adiponectin receptor-1 expression is associated with good prognosis in gastric cancer. JECCR. 2011; 30:107.
149. Kim A Y, Lee Y S, Kim K H, et al. Adiponectin Represses Colon Cancer Cell Proliferation via AdipoR1- and -R2-Mediated AMPK Activation. Mol Endocrinol. 2010; 24(7):1441–1452.

150. Lee S-A, Sung H, Han W, et al. Serum Adiponectin but not Leptin at Diagnosis as a Predictor of Breast Cancer Survival. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15:6137-6143.