



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
BIOMEDICINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“Efecto del suero de mujeres con diferentes grados de obesidad tratadas con metformina sobre la proliferación y muerte en la línea celular MCF-7”**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
**HERNÁNDEZ JUÁREZ ALFREDO JAVIER**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M.  
COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO MATÍNEZ MONTES  
FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.  
DRA. MARINA MACIAS SILVA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.

**MEXICO. CIUDAD DE MEXICO. SEPTIEMBRE. 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
BIOMEDICINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“Efecto del suero de mujeres con diferentes grados de obesidad tratadas con metformina sobre la proliferación y muerte en la línea celular MCF-7”**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
**HERNÁNDEZ JUÁREZ ALFREDO JAVIER**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M.  
COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO MATÍNEZ MONTES  
FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.  
DRA. MARINA MACIAS SILVA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.

**MEXICO. CIUDAD DE MEXICO. AGOSTO. 2016**



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM.  
Presente

Me permito informarle a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de febrero del 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del alumno HERNÁNDEZ JUÁREZ ALFREDO JAVIER con número de cuenta 303058748 con la tesis titulada "Efecto del suero de mujeres con diferentes grados de obesidad tratadas con metformina sobre la proliferación y muerte en la línea celular MCF-7", realizada bajo la dirección del DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES:

Presidente: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA  
Vocal: DRÁ. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Secretario: DRA. MARINA MACÍAS SILVA  
Suplente: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES  
Suplente: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. de Mx., a 2 de junio del 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## AGRADECIMIENTOS

- A) Principalmente al Posgrado en Ciencias Biológicas por permitirme ingresar a un posgrado de calidad y desarrollarme en el ambiente científico.
- B) Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología por otorgarme el apoyo económico para concluir mis estudios de maestría con **No 294532 CVU 545372**
- C) Miembros del Comité Tutor
  - a. Al **Dr. Alejandro Zentella** mi tutor principal, por la oportunidad que me brindó de pertenecer a su laboratorio.
  - b. Al **Dr. Federico Martínez Montes** y a la **Dra. Marina Macías Silva** por su tutoría y guía en el desarrollo de este proyecto

## **Agradecimientos**

Al **Dr. Alejandro Zentella** mi tutor principal y maestro en la ciencia y conocimiento, sin sus consejos, tiempo y dedicación no hubiera podido superarme a mí mismo y obtener una visión de la ciencia diferente. Gracias por la oportunidad que me brindó de pertenecer en su laboratorio. También agradezco su manera de enseñar y su manera de abordar un tema con metáforas, con esta forma, entender un tema desde lo básico hasta lo más avanzado.

Al **M en C. José Luis Venturas Gallegos**, por compartir y enseñarme las técnicas de laboratorio que use para mi proyecto, desde cultivo de células hasta inmunoensayos tipo Western. Con su ayuda no podría haber terminado mi proyecto de maestría, así como también, su consejo y guía en mi proyecto.

Al **Dr. Federico Martínez Montes**, por sus comentarios acertados tanto en a mi persona como manejo de la información. Sus comentarios me hicieron aprender a organizar y refinar la información para un mayor entendimiento de una idea o fenómeno.

Y por último pero no menos importante a la **Dra. Marina Macías**, sus consejos y actitud ante mi trabajo me otorgaron que siempre hay una visión diferente a los que se busca y que tener en cuenta detalles diferentes al objetivo siempre es bueno para fundar y entender un fenómeno biológico.

Al grupo conformado por el **Dr. Eduardo García García** jefe de la Clínica de Obesidad y Trastornos de la Conducta Alimentarios del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, el **Dr. Juan Pablo Méndez Blanco** Coordinador de la Unidad de Investigación en Obesidad de la Facultad de Medicina UNAM por sus comentarios, dirección y diseño de este estudio, a la **Dra Maria Augusta Narajo** y la **Dra Janette Bermeo** por su participación en este estudio.



Un agradecimiento especial a **Laboratorio Silanes**, por su gran apoyo en la realización de este estudio y suministro del fármaco metformina utilizado en este proyecto.

A **mi familia**, que por más escenarios y situaciones difíciles nos enfrentemos, siempre saldremos adelante. **Mamá, papá** por su apoyo incondicional y sus consejos para seguir adelante en mi camino hacia lo que me he trazado.



## **Dedicatoria**

A ti **Carolina Blanco Flores** por tu paciencia, apoyo incondicional, comprensión, ternura y amor. Gracias por estar todo este tiempo conmigo y caminar junto a mi todo este largo camino hasta este punto. A lo largo de este proceso, hemos enfrentado cosas y las seguiremos enfrentando. Lo que puedo decir es que siempre contigo encontrar un motivo, la inspiración para continuar hacia adelante para terminar, completar nuestro sueños y metas que hemos planteado. Gracias por ser y convertirte en lo mejor que tengo.

**THA F.F 25/07**

# Índice

<b>I. Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>III. Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>III.1 Cáncer de Mama .....</b>	<b>4</b>
III 1.1 Estrógenos y el desarrollo del CaM .....	6
III 1.2 CaM hereditario .....	6
III 1.3 Factores de riesgo.....	6
III 1.4 Patogénesis del CaM .....	7
III 1.5 Carcinogénesis ER dependiente .....	9
IV 1.6 Carcinogénesis ER independiente .....	11
<b>III 2. CaM, obesidad y SMet .....</b>	<b>13</b>
III 2.1 Patogénesis de CaM y su relación con obesidad y SMet .....	13
III 2.2 Definición de SMet.....	17
III 2.3 Obesidad .....	20
<b>III. 3 Metformina.....</b>	<b>21</b>
IV 3.1 Epidemiología.....	24
IV 3.2 Metformina como agente anticancerígeno .....	25
IV 3.3 Efecto directo de metformina .....	25
IV 3.4 Efecto indirecto de metformina.....	27
IV 3.5 Efecto de metformina en obesidad y síndrome metabólico .....	28
<b>IV. Antecedentes.....</b>	<b>29</b>
<b>V. Objetivos .....</b>	<b>31</b>
<b>VI. Materiales y Métodos.....</b>	<b>32</b>
Tipo y diseño del estudio .....	32
Descripción de la maniobra de intervención .....	32
Población y tamaño de muestra.....	32
Asignación de tratamiento .....	33
Grupo de estudio .....	33
Duración del seguimiento individual .....	33
Criterios de inclusión.....	34
Criterios de exclusión.....	34
Criterios de eliminación .....	35
Variables evaluadas.....	35
Protocolo para la extracción de suero humano .....	36
Ensayo de proliferación.....	37
ELISA Bio-PLEX.....	39
Análisis estadístico .....	39
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
VIII. 1 Población.....	41
VIII. 3 Elisa multiplex.....	45
<b>Ensayo de proliferación.....</b>	<b>55</b>
Obesidad grado I.....	55
Obesidad Grado III .....	57

<b>VIII. Discusión</b> .....	<b>66</b>
<b>IX. Conclusión</b> .....	<b>72</b>
<b>X. Referencias</b> .....	<b>73</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>85</b>
Anexo I. Criterios de inclusión y exclusión del Programa de Atención al Paciente con Obesidad.....	85
<b>Criterios de inclusión</b> .....	<b>85</b>
Anexo II. Consentimiento informado.....	86
Anexo III. Comparación de la actividad de sueros humanos después de dos ciclos de congelación, concentración de suero y activación e inactivación del complemento.....	94
Anexo IV. Técnica de cristal violeta.....	97
Anexo V. Concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento obesidad grado I. ....	98
Anexo VI. Concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento obesidad grado III. ....	99
Anexo VII. Tabla representativa de datos de hombres y mujeres analizados. ....	100

## I. Resumen

El síndrome metabólico (SMet) se caracteriza por presentar al menos tres de las siguientes características: obesidad, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipertensión, y dislipidemia, y está identificado como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2, así como también, se ha asociado a múltiples tipos de cáncer, entre ellos, formas de cánceres que son dependientes de hormonas como es el caso del cáncer de mama (CaM). En la actualidad la presencia de los factores del SMet son más comunes en la población general a nivel mundial. En México con el aumento en la incidencia de la obesidad el SMet es cada vez más frecuente. La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de CaM en mujeres postmenopáusicas. La acumulación de tejido adiposo visceral lleva a un estado metabólico alterado que afecta principalmente la producción de hormonas sexuales, citocinas pro-inflamatorias, adipocinas y hormonas como insulina y glucagón. Recientemente, con el apoyo de estudios clínicos retrospectivos y prospectivos, se ha establecido una asociación con los factores del SMet y el CaM en mujeres postmenopáusicas.

El fármaco metformina forma parte del grupo de fármacos hipoglucemiantes denominados biguanidas, y es considerado hoy en día uno de los principales medicamentos prescritos para tratar concentraciones altas de glucosa y de insulina en sangre a nivel mundial. Desde hace 20 años se consideró que el mecanismo principal de metformina era la inhibición de la gluconeogénesis hepática y explicaba la reducción de la concentración de glucosa e insulina en sangre. Sin embargo, a partir del 2006, un estudio retrospectivo encontró que en pacientes con diabetes tipo II y tratamiento con metformina, la incidencia de CaM era menor comparada con la administración de otros tipos de hipoglucemiantes, como sulfonilureas, sugiriendo que metformina presenta una acción protectora contra CaM. Desde entonces, metformina ha sido evaluada en diferentes estudios oncológicos *in vivo* e *in vitro*. La metformina es capaz de inhibir la proliferación, inducir efectos biológicos sobre vías metabólicas, y desencadenar procesos de muerte celular. A pesar de los efectos mostrados por metformina en varios modelos de estudio y varios tipos de cánceres, el mecanismo que media estos

efectos sigue sin estar claro. Se postula que metformina es capaz de inducir algunos de estos efectos a través de mecanismos que no involucran a sus blancos moleculares clásicos como AMPK. Varios estudios han mencionado que metformina puede inducir un efecto indirecto y disminuir la concentración de insulina, la glucosa y el IGF-1. Sin embargo, hasta ahora no se han de caracterizado los efectos séricos de metformina *in vivo* e *in vitro*.

Aquí se presenta el primer estudio piloto que muestra cambios séricos inducidos por el tratamiento con metformina sobre moléculas que se encuentran en el suero de pacientes con diferentes grados de obesidad. Las moléculas alteradas son citocinas como IL-2, IL-1 $\beta$  etc., factores de crecimiento, como VEGF y quimiocinas como Eotaxina. También, se detectaron cambios inducidos por metformina en los sueros de individuos mujeres a través de un cultivo celular de MCF-7, observando un efecto de inducción a la muerte celular en aquellos sueros obtenidos de pacientes después de 10 y 20 semanas de tratamiento con este fármaco. Las células MCF-7 fueron usadas como un biosensor de cambios en la composición sérica inducida por metformina.

## II. Abstract

Metabolic syndrome (MetS) is a clustering of at least three of five of the following medical conditions: abdominal (central) obesity, elevated blood pressure, elevated fasting plasma glucose, high serum triglycerides, and low high-density lipoprotein (HDL) levels. The MetS is identified as a risk factor for developing cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus and it has also been associated multiple cancers, including hormone-dependent cancer, like breast cancer (BC). Today the presences of MetS factors are more common in the worldwide population. In Mexico with the increased incidence of obesity, MetS it is becoming more frequent. Obesity is a risk factor for the development of BC in postmenopausal women. The accumulation of visceral adipose tissue leading to an altered metabolic state that mainly affects the production of sex hormones; pro-inflammatory cytokines, adipokines and hormones like are insulin and glucagon. Recently, with the support of retrospective and prospective clinical studies, it has established an association between the factors of MetS and BC in postmenopausal women.

Metformin belongs to the group of drugs called biguanides, and today it is one of the main drugs prescribed to treat high levels of glucose and insulin worldwide. 20 years ago, the scientists demonstrated that the mechanism of metformin is the inhibition of hepatic gluconeogenesis and explains the lowering effect on glucose and insulin levels. However, since 2006, a retrospective study found that in diabetic patients with breast cancer and metformin treatment, the incidence of breast cancer was lower compared with the administration of other hypoglycemic agents, as sulfonylureas, suggesting that metformin It has a protective action for this cancer.

Since metformin was evaluated in different cancers *in vivo* and *in vitro*. Metformin is able to inhibit proliferation, induces biological effects on metabolic pathways, and trigger cell death processes. Despite the effects shown by metformin in several study models, the mechanism of these effects remains unclear. It has postulated that metformin can induce some of these effects through a mechanism that does not involve their classics molecular targets, like mTOR. Several studies have mentioned that metformin may induce an indirect effect and reduce insulin levels, glucose and IGF-1. However, so far it has not finished characterize serum effects of metformin *in vivo* and *in vitro*.

Here, we present the first study that shows the changes in the sera of women with different obesity grades by metformin. Cytokines such as IL-2, IL-1 $\beta$  , growth factors such as VEGF and chemokines as Eotaxin showed differences in response a metformin treatment. In addition, the sera of women after 10 and 20 weeks of metformin treatment induce a cell death effect on the cell line MCF-7. This cell line was used as a biosensor to detect changes in the serum by metformin.

### III. Introducción

#### III.1 Cáncer de Mama.

El CaM es la neoplasia con más frecuencia de diagnóstico y es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres en todo el mundo; representa el 23% (1,38 millones) del total de nuevos casos de cáncer y el 14% (458.400) del total de muertes por cáncer en 2008[1]. Aproximadamente la mitad de los casos de CaM y cerca del 60% de muertes ocurre en países en vías de desarrollo[1]. La variación en la tasa de incidencia en el mundo, se cree, que es debido a diferencias en los patrones reproductivos y otros factores hormonales, así como la aplicación de pruebas para la detección temprana del CaM [2], [3].

Ahora es ampliamente reconocido que el CaM no es una sola enfermedad, sino que comprende un conjunto de diferentes subtipos que se pueden distinguir por las características moleculares y genéticas presentes en las células que conforman el tumor. Las diferencias en la expresión del receptor de estrógenos alfa (ER, por sus siglas en inglés), el receptor de progesterona beta (PR, por sus siglas en inglés) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, por sus siglas en inglés) sirven como guía para distinguir los diferentes subtipos de CaM (Tabla 1)[4].

Los tumores positivos a receptores hormonales (HR +, definidos como ER + / PR +) pueden subdividirse en luminal A y luminal B; este último con una menor prevalencia, sin embargo, lleva a un peor pronóstico. En cuanto a HER2, el diagnóstico por hibridación *in situ* puede presentar falsos positivos denominados equívocos. En contraste a un diagnóstico de HER2 inequívoco positivo que se define como intensa tinción de membrana uniforme > 10% de las células tumorales invasoras [9]. Tumores HER2+ representan el 10% de todos los tipos de CaM. Los tumores de mama triple negativo (TNM) se definen por la ausencia de ER, PR y HER2 y representa entre el 10-20% de todos los diagnósticos de CaM [5]–[7]. Los esfuerzos para clasificar en subtipos al CaM, con técnicas de micro arreglos, han demostrado que la mayoría (71-91%) de TNM coinciden con algunas de las características del perfil de expresión del subtipo basal. En contraste, CaM tipo basal, no tiene un fenotipo triple negativo y puede expresar

ER o HER2 y tiene una prevalencia de hasta el 20%. Por otra parte, no existe un consenso ampliamente aceptado sobre cómo debe definirse este subtipo molecular; por ejemplo, en dos estudios recientes, la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) se trató alternativamente como un marcador de cáncer de tipo basal dentro de las categorías de TNCM [11, 12]. Dada la falta de consenso sobre cómo definir molecularmente cánceres basales, los estudios recientes se enfocan en si los subtipos dentro de esta forma de cáncer podrían predecir la supervivencia y han producido conclusiones con controversias sobre la implicación pronóstica de los marcadores basales[4], [8].


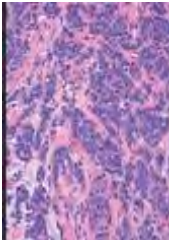
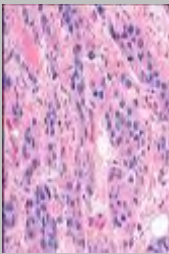
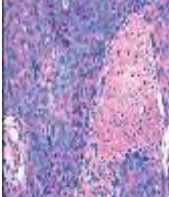
Subtipos	Características moleculares	Histología	Prevalencia (%)	Características clínicas
<b>Luminal A</b>	ER+ y/o PR+ HER2-, Baja expresión de Ki67		40	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento lento</li> <li>• Menor agresión</li> <li>• Baja recurrencia</li> <li>• Alta supervivencia</li> <li>• Mejor pronóstico en comparación a los demás subtipos</li> <li>• Respuesta a terapia hormonal</li> </ul>
<b>Luminal B</b>	ER+ y/o PR+, HER2+ (o HER2- con alta expresión de Ki67)		10-20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta tasa de proliferación</li> <li>• Peor pronóstico comparado con el Luminal A</li> <li>• Respuesta a terapia hormonal</li> </ul>
<b>HER-2 sobre expresión</b>	Positivo para el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR2), ER, PR-		10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tendencia a crecer y expandirse agresivamente</li> <li>• Pobre pronóstico de supervivencia a periodos cortos</li> <li>• Existen terapias moleculares</li> </ul>
<b>TNCM</b>	ER-, PR-, HER2-		10-20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnosticado a menor edad</li> <li>• Alta tasa de recurrencia después de la intervención quirúrgica</li> <li>• Carece de terapia eficaz</li> </ul>

Tabla 1. Características clínicas y moleculares de los subtipos de CaM [9,11,12].



### **III 1.1 Estrógenos y el desarrollo del CaM**

El CaM requiere un suministro hormonal para desarrollarse, al igual que el tejido normal mamario. El riesgo de este cáncer aumenta con la exposición a los estrógenos a lo largo de la vida. La mayoría de tipos de CaM son sensibles al estrógeno, lo que significa, que pueden expresar receptores de estrógeno y proliferar en respuesta a su activación. Terapias endocrinas que inhiben la producción de estrógeno son eficaces en el tratamiento contra el CaM sensible a hormonas.

### **III 1.2 CaM hereditario**

Aproximadamente el 5-10% del CaM son hereditarios, lo que significa que hay una mutación genética conocida causando un aumento en el riesgo de cáncer en la familia del paciente. El Síndrome de CaM y ovario hereditario (SCMOH) es causado por mutaciones en dos genes, BRCA1 y BRCA2. Estos genes codifican para una vía de reparación del DNA importante para la protección contra las mutaciones. La pérdida de cualquiera de los genes aumenta el riesgo de desarrollar CaM, así como otros tipos de cáncer [9].

### **III 1.3 Factores de riesgo**

Aparte del sexo, la edad y los antecedentes familiares, el riesgo de desarrollar CaM es en gran parte debido al perfil de factores de riesgo reproductivos de la mujer que se refleja directamente en la exposición a las hormonas sexuales. El riesgo de desarrollar CaM aumenta con la menarca temprana, menopausia tardía, y la nuliparidad, mientras que, el riesgo se reduce con mayor paridad y la lactancia. Los datos de estudios epidemiológicos recientes proporcionan evidencia que respalda los efectos diferenciales de factores de riesgo reproductivo en el riesgo de desarrollar tumores positivos o negativos, esta diversidad ayuda a explicar la heterogeneidad etiológica entre los tumores de mama (Tabla 2) [10]–[23].

### III 1.4 Patogénesis del CaM

Como se ha mencionado, el factor de riesgo más importante para el desarrollo de CaM es la sobre exposición a estrógenos. Existen dos principales teorías acerca de la acción de estrógenos en el desarrollo de CaM, (1) los metabolitos de los estrógenos que inducen un efecto genotóxico vía radicales libres que afectan al DNA y apoyan la inestabilidad genómica del CaM y (2) las propiedades proliferativas y antiapoptóticas propias de los estrógenos por estimulación del ER- $\alpha$  conduce a un estado hiper proliferativo en pacientes que tienen sobre expresión del ER- $\alpha$ , cuando a este escenario se suma un evento iniciador de la carcinogénesis, la sobre estimulación de ER- $\alpha$  promueve el manteamiento de células tumorales mamarias [24]–[26].

<b>Factor</b>	<b>Característica</b>
<b>Género</b>	<b>Mujeres:</b> Factor de riesgo primario, la proporción de riesgo a lo largo de la vida es de 1:8 comparado con el de los hombres que es de 1:1000
<b>Edad</b>	<b>El envejecimiento:</b> Aumenta el riesgo de CaM. A los 40 años de vida el riesgo es 1:27 y a los 80 años es de 1:10
<b>Índice de masa corporal</b>	<b>IMC &gt; 30:</b> Aumenta el riesgo de CaM, se supone que es a la producción de estrógenos por el tejido adiposo por a la acción de la aromatasa.
<b>Historia reproductiva</b>	<b>Edad tardía (&gt;35) del primer embarazo y nuliparidad:</b> El embarazo induce la diferenciación de células luminales por la exposición a (hGC). La expresión génica en la mama cambia permanentemente después del embarazo, incrementando los mecanismos de reparación del DNA y controlando el proceso apoptótico
<b>Exposición a estrógenos</b>	<b>Terapia de reemplazo hormonal:</b> La combinación de la terapia de estrógenos con progesterona durante la menopausia está asociada al desarrollo de CaM en mujeres postmenopáusicas <b>Alcohol:</b> Varios estudios [23] han demostrado que el consumo de alcohol en mujeres postmenopáusicas aumenta el riesgo de desarrollo de CaM y se relaciona a la cantidad consumida. <b>Tabaco:</b> El consumo de tabaco aumenta el riesgo de CaM durante la juventud, así como también, después del primer embarazo añoso. <b>Radiación:</b> El tejido mamario es sensible a radiaciones ionizantes.
<b>Mutaciones BRCA1/2</b>	5-10% de los casos de cánceres son causados por mutaciones genéticas en los genes BRCA1/2, mujeres que tienen mutaciones en estos genes tienen el 50-80% de probabilidad de desarrollar CaM durante su vida.

Tabla 2. Factores de riesgo asociados con CaM [12,14,19,22].

### III 1.5 Carcinogénesis ER dependiente

Existen dos tipos diferentes de receptores de estrógenos, alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) (ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  respectivamente). Diversos tejidos expresan estos receptores, mama, ovarios y el endometrio expresan ER- $\alpha$ , mientras los riñones, el cerebro, los pulmones y otros órganos expresan ER- $\beta$ . El mecanismo de ER- $\beta$  en la carcinogénesis sigue siendo controvertido, mientras que, existe una evidencia fuerte y clara de la participación de ER-alfa en CaM. Ambos subtipos ER llevan un dominio de unión a DNA y existen en el núcleo y el citosol. En la vía nuclear, cuando el estrógeno entra en la célula, se une al ER y el complejo migra hacia el núcleo y conduce a la producción de las proteínas de transcripción que inducen cambios en la célula. Por otra parte, en la vía de señalización citoplasmática, el estrógeno activa directamente una cascada de proteínas que llevan a la activación de cinasas con un alto potencial proliferativo, como son las MAP cinasas (MAPK, por sus siglas en inglés), e indirectamente la activación de receptores como EGF e IGF-1, que potencializan la respuesta proliferativa. Ambos mecanismos son de consecuencias negativas para pacientes con CaM (Figura 2) [25], [27], [28].

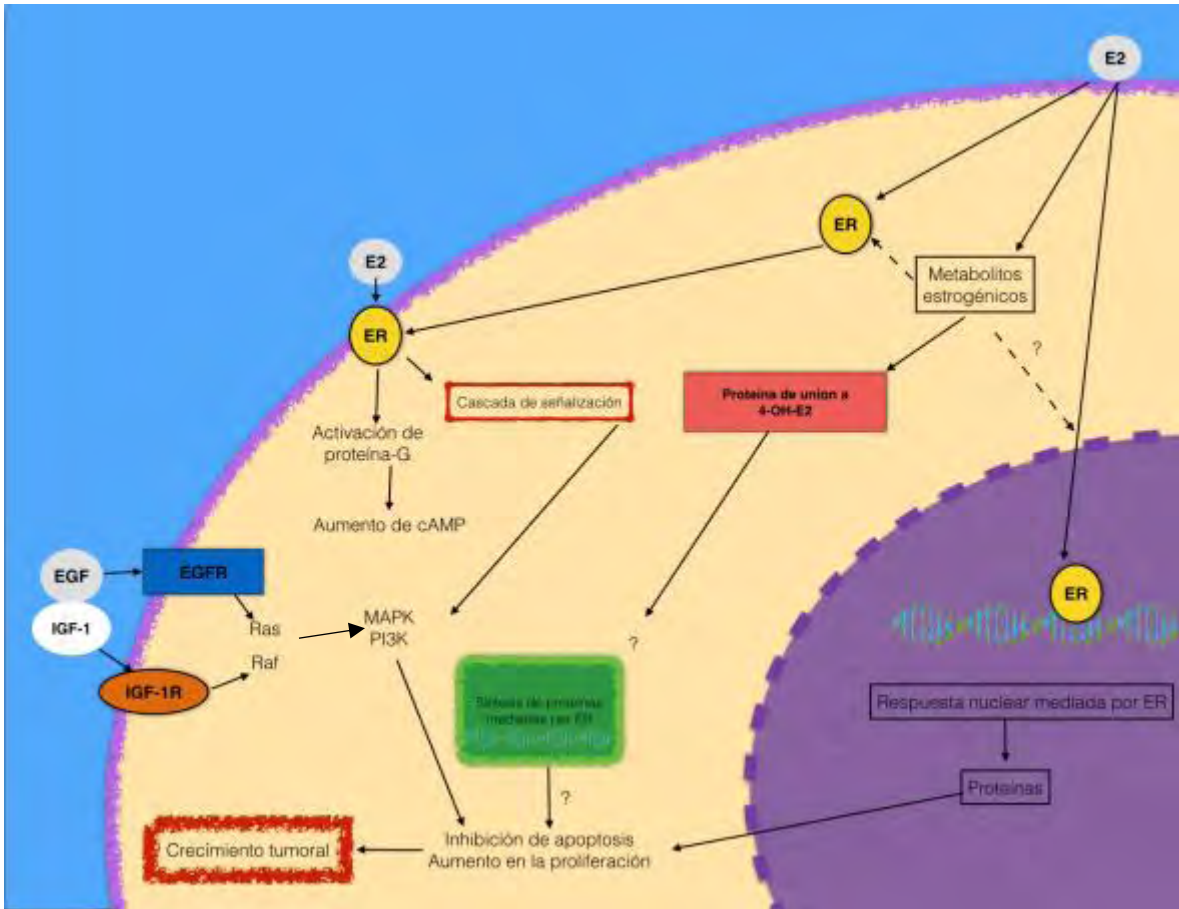


Figura 1. Vía de señalización de ER y EGF, y sus efectos en células tumorales. Tomado y modificado de [29].

#### IV 1.6 Carcinogénesis ER independiente

Estudios en roedores han demostrado que los estrógenos y/o sus metabolitos activos provocan carcinogénesis en diversos tejidos como riñón, hígado y mama [28], [30]. Los metabolitos activos de los estrógenos E1 (estrona) y E2 (estradiol) y/o el catecol pueden ser producidos por diferentes vías (Figura 3), y a diferencia de la carcinogénesis dependiente de RE, estos metabolitos puede inducir efectos directos en el DNA [30].

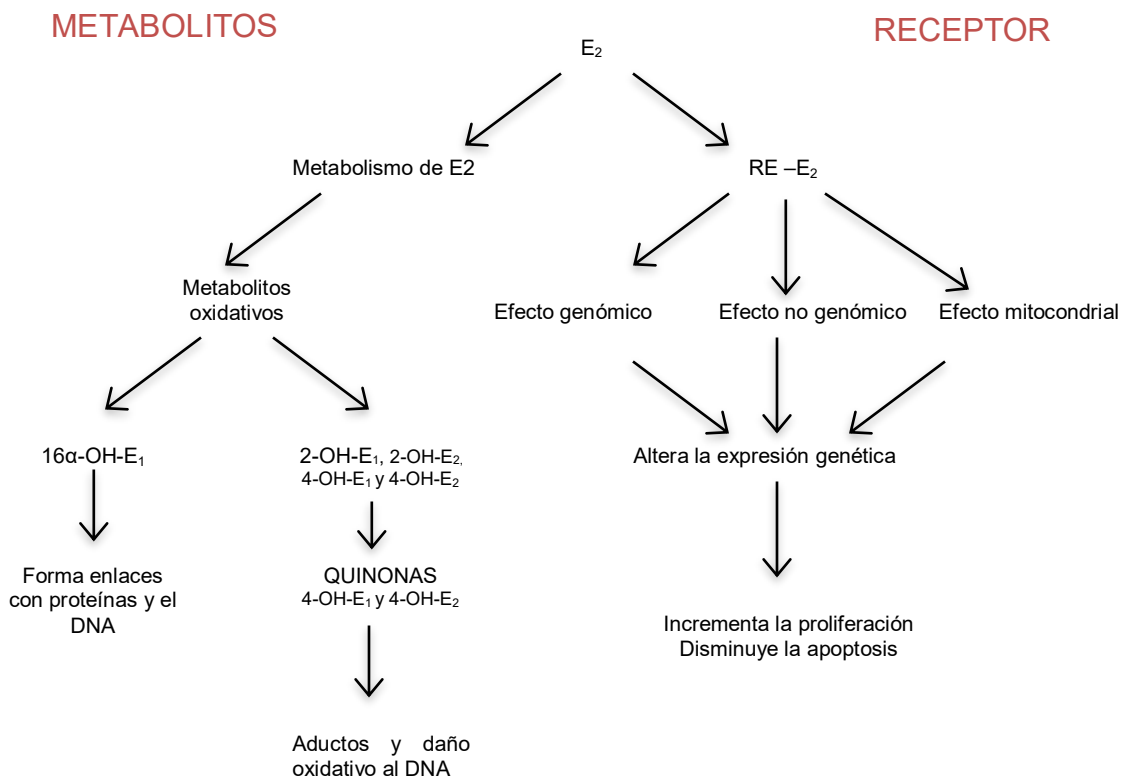


Figura 2. Principales vías de la carcinogénesis en tejido mamario [34].

El metabolismo de estrógenos en humanos necesita de varios citocromos p450 para poder producir las quinonas a partir de E<sub>1</sub>. La producción de las quinonas a través de vías oxidativas utiliza principalmente al metabolito secundario de la estrona llamado catecol. El catecol sufre un proceso de modificaciones enzimáticas por citocromos para producir predominantemente al 2-OH-catecol. Este metabolito secundario es necesario para producir semiquinonas. Estudios

recientes han propuesto el uso de los metabolitos secundarios del catecol como biomarcadores de riesgo de desarrollo del CaM [25], [31].

A pesar de la fuerte evidencia sobre el impacto de la exposición de estrógenos en el desarrollo de CaM y aún con fármacos inhibidores de éstos, también se ha enfocado en la sobre producción de estrógenos en mujeres postmenopáusicas. El CaM como se ha mencionado anteriormente es una enfermedad compleja que no depende de un solo factor, sino de un conjunto de factores, que aumenta sustancialmente el riesgo de padecer este tipo de cáncer. En los últimos años, la presencia de otras enfermedades ha llamado la atención de médicos e investigadores. Estas enfermedades en un principio se mantuvieron independientes al desarrollo de distintos tipos de cáncer. En la actualidad, las comorbilidades del Síndrome Metabólico (SMet), la obesidad y el desarrollo de cáncer, específicamente CaM, han aumentado exponencialmente afectando millones de personas a nivel mundial. Hoy en día se reconoce a la obesidad como un factor de riesgo importante para el desarrollo de CaM y éste forma parte del complejo de factores de riesgo del SMet, que se abordara en el siguiente capítulo.

## **III 2. CaM, obesidad y SMet**

### **III 2.1 Patogénesis de CaM y su relación con obesidad y SMet**

Anteriormente se mencionó que el tejido adiposo desempeña un papel clave en la fisiopatología del síndrome metabólico y de muchos tipos de cáncer. Tradicionalmente, el tejido adiposo se ha considerado como un órgano de almacenamiento y la movilización de los lípidos. Sin embargo, se ha incrementado el interés científico por este tejido y recientemente se considera un órgano endocrino activo, al desempeñar un papel primordial en la integración de metabolismo sistémico, debido a su capacidad de secretar una gran cantidad de factores bioactivos que modulan varias cascadas de señalización: las llamadas adipocinas [32]. El tejido adiposo es un órgano secretor y presenta varias características importantes como: depósitos grasos (visceral y subcutáneo), que presentan diferentes capacidades metabólicas y secretan adipocitocinas distintas [33] y depósitos de tejido adiposo, que se componen de diferentes tipos de células y da un soporte estructural, funcional e inmunológico. Además, los vasos sanguíneos muestran una doble función: suministrar nutrientes, oxígeno y difundir mediadores como citocinas y quimiocinas a los tejidos distantes. La Tabla 4 muestra una lista de adipocinas principalmente involucradas en la obesidad visceral y sus efectos nocivos establecidos.



<b>Adipocinas</b>	<b>Efectos</b>
<b>Factor de necrosis tumoral (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodelación de tejido adiposo</li> <li>• Resistencia a la insulina</li> <li>• Incrementa ECV</li> <li>• Disminuye el efecto de insulina y leptina</li> </ul>
<b>IL-6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula la lipólisis y libera la proteína C reactiva</li> </ul>
<b>MCP-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor quimiotáctico, mantiene el estado de inflamación</li> </ul>
<b>PAI-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promotor del estado protrombótico</li> </ul>
<b>Angiotensinógeno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eleva la presión sanguínea</li> </ul>
<b>RBP-4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistencia a la insulina</li> </ul>
<b>Leptina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incrementa angiogénesis</li> </ul>
<b>Visfatina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor quimiotáctico, promueve la estimulación de citocinas</li> </ul>
<b>Resistina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperglicemia</li> </ul>

Tabla 4. Resumen de las principales adipocinas y sus efectos biológicos

El tejido adiposo en los pacientes con SMet se caracteriza por la desregulación en la producción de citocinas, que pueden desencadenar procesos biológicos relacionados con la inflamación. Estos procesos y sus mediadores pueden estar involucrados en el desarrollo de tumores [34], [35]. Los datos experimentales y epidemiológicos evidencian una conexión entre el síndrome metabólico y aumento del riesgo de CaM [36].

El receptor de la insulina (RI) y el IGF-1 receptor (IGF1R) se estimulan en exceso en el SMet. El IR tiene dos subtipos, IR-A y IR-B, que tienen diferentes roles. IR-B está relacionado con las respuestas metabólicas de la insulina (por ejemplo, la captación de glucosa), mientras que IR-A es responsable de la señalización intracelular que culmina en respuestas mitogénicas [37], [38]. Estos efectos son características del desarrollo del cáncer, y se asocian con la resistencia a la terapia de CaM. IGF-2 es principalmente un factor de crecimiento fetal, pero también se produce en los tejidos adultos. Actuando a través receptores IR-A, IGF1R e híbridos, IGF-2 conduce a la señalización y la división celular mitogénica.

IGF-1 e IGF-2 circulan en la sangre unido a proteínas de unión a IGF (IGFBP) que mejoran sus vidas medias, protegiéndolos de la destrucción y regulan su biodisponibilidad. IGFBP-3, la IGFBP predominante circula en el suero, es producido por el hígado, siendo estimulado por GH e inhibida por la insulina. Por lo tanto, los estados de hiperinsulinemia (muy comunes en el SMet) resultan en una menor producción de IGFBP y mayor concentración de IGF libre que están disponibles para actuar en sus receptores. IGFBP-3 también es capaz de inhibir el crecimiento celular y la promoción de la apoptosis [29] y [32]. Varios estudios revelaron que el aumento en la concentración de IGF-1, IGF-2 y la insulina que se encuentra en el SMet y conduce a la sobre estimulación de sus receptores y se asocian con el desarrollo de CaM. Sin embargo, una vez más, no se identifican los mecanismos.

Una enorme cantidad de hormonas y factores agravan en condiciones de SMet, y desarrollan un efecto crucial en el desarrollo del riesgo de cáncer (Figura 4).

La leptina tiene un papel crucial en la carcinogénesis asociada con aumento de la angiogénesis, una condición necesaria para la progresión del tumor. De hecho, la leptina es conocida por promover la secreción de VEGF, a través de HIF-1 $\alpha$  y la activación de NF-kB. Curiosamente, los estudios del ratón concluyeron que la leptina estimula la proliferación celular a través de las vías de señalización Akt y mTOR que implica su papel en la estimulación del desarrollo y progresión del cáncer. De acuerdo, a estudios *in vitro* [39], [40], se estableció q que además de sus efectos metabólicos, pro-inflamatorios y neuroendocrinos, la leptina también promueve la expansión de las células de cáncer humano a través de varias vías de señalización diferentes. En conjunto, estos hallazgos indican que esta hormona es una molécula fundamental que une al SMet y al cáncer. Sin embargo, a pesar de los estudios *in vitro* y experimentales han demostrado que la leptina puede ser carcinogénica a dosis muy altas en modelos murinos, no hay evidencia observada en seres humanos que la leptina a dosis fisiológicas tenga un efecto carcinogénico [32], [41]–[46].

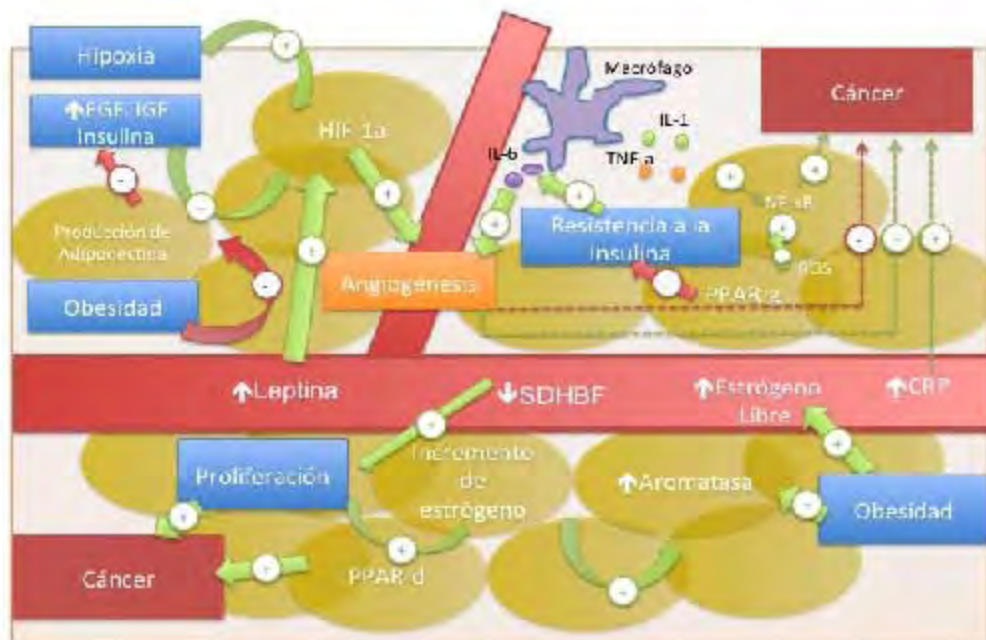
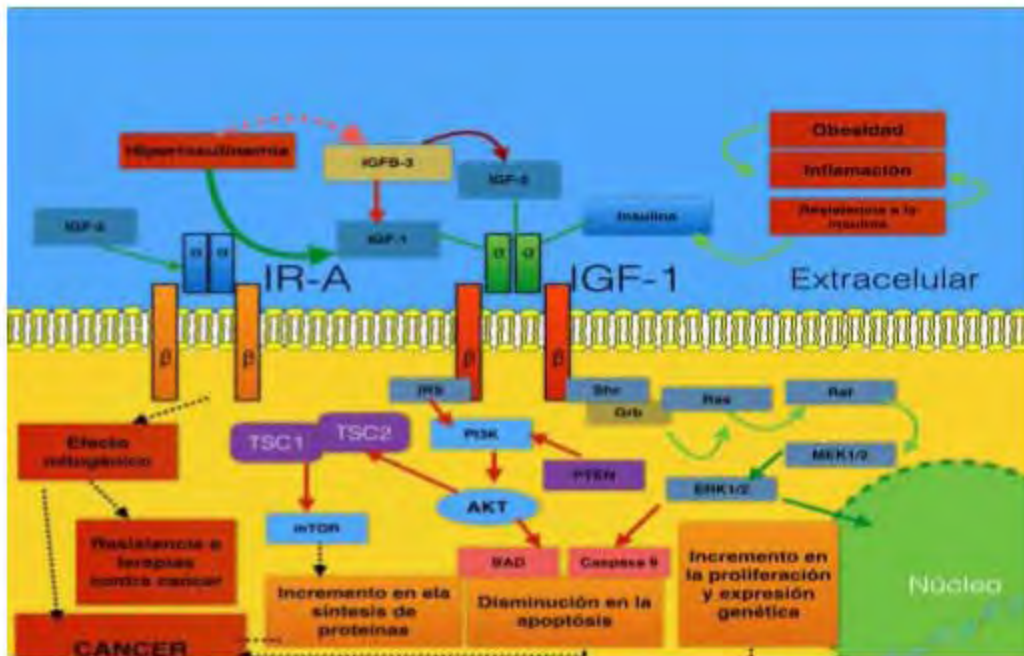


Figura 3. Posibles mecanismos involucrados en la obesidad y SMet que aumentan el riesgo de CaM [47], [48].

### III 2.2 Definición de SMet

La combinación de diversas alteraciones metabólicas, son ahora agrupadas con el nombre de síndrome metabólico (SMet), descrito por primera vez por Kylin en la década de 1920. Dos décadas más tarde, Vague señaló que el aumento de la adiposidad corporal, principalmente en la zona abdomino-visceral se presentaba con más frecuencia en las alteraciones metabólicas observadas con la diabetes y la enfermedad cardiovascular (ECV). Durante la Conferencia de Banting en 1988, Raven usó el término "Síndrome X" y estableció firmemente la importancia clínica de este síndrome, aunque la obesidad no se incluyó. En 1989, Kaplan le cambió el nombre a 'El cuarteto de la muerte' y otros luego solo lo nombraron con el término 'El síndrome de resistencia a la insulina' [49]–[51].

Definiciones recientes han tenido controversias en los criterios que se deben manejar en la presencia del SMet. La más aceptada de estas definiciones ha sido sugerida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR) y el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol y el Panel III de Tratamiento del Adulto (NCEP ATP III, por sus siglas en inglés). Todos estos grupos están de acuerdo que los componentes básicos del SMet son: la obesidad, la resistencia a la insulina, dislipidemias e hipertensión. Sin embargo, proporcionan diferentes criterios clínicos para identificar el SMet en cuanto a resistencia a la insulina e hiperglicemia. Por ejemplo, a diferencia de las otras definiciones, la definición de la ATP III no requiere obligatoriamente que esté afectado el metabolismo de la glucosa o resistencia a la insulina como un componente esencial para el diagnóstico [52].

En mayo de 2004, la Federación Internacional de Diabetes celebró un taller de expertos para examinar cómo las definiciones actuales disponibles del SMet podrían ser mejoradas con el objetivo de llegar a un consenso para la introducción de una nueva y unificada definición del SMet en todo el mundo. El grupo consideró oportuno la creciente epidemia de obesidad para volver a actualizar los niveles de corte para el diagnóstico de este síndrome. Se acordó que la definición no sólo debe reflejar el agrupamiento estadístico de los diversos componentes potenciales

de los SMet, sino también centrar la predicción de ECV. Así, la definición debe ser fácil de usar en el diagnóstico clínico sin la necesidad de determinaciones que normalmente sólo están disponibles en entornos de investigación [53].

La definición que resultó fue: El SMet es un síndrome que se define como un complejo reconocible de síntomas y hallazgos físicos o bioquímicos para el que no se entiende una causa directa. Debido a que es un síndrome, los componentes coexisten de forma dinámica y no se puede adjudicar una causa para la presencia del SMet [19]. Cuando se identifican los mecanismos causales, el síndrome se convierte en una enfermedad. Sin embargo, controversias han surgido con esta nueva definición, por un lado, modelos estadísticos no pueden reconocer una causalidad, y no pueden diferenciar si es un mecanismo o mecanismos en común. Entender la naturaleza del síndrome sin un evento causal ha llevado a muchos médicos e investigadores a decir que el SMet no existe. Actualmente, sigue el debate del factor causal unificador del SMet por lo que los expertos han dejado la definición como un síndrome que contiene los siguientes componentes (Tabla 3) [54]–[61].

<b>Componentes</b>	<b>Característica</b>
<b>Distribución anormal de grasa corporal</b>	Incremento en la adiposidad definido por IMC > 30 y circunferencia de cintura mayor a 100 cm
<b>Resistencia a la Insulina</b>	Esta presenta en la mayoría de personas con SMet y fuertemente asociado a los demás componentes del síndrome. Sin embargo, es tratado a parte, ya el mecanismo de acción es bien conocido, aunque sigue en investigación.
<b>Dislipidemia iatrogénica</b>	Se encuentra con mayor frecuencia con niveles altos de LDL y bajos de HDL
<b>Elevada presión sanguínea</b>	Presencia de hipertensión, junto con hiperglicemia está asociado a mayor riesgo para ECV. Varía de una población a otra.
<b>Estado pro -inflamatorio</b>	La obesidad contribuye a este estado y está asociado a concentraciones altas de proteína C reactiva
<b>Estado Protrombótico</b>	Recientemente se relacionó concentraciones altas de PAI-1 con los demás componentes del SMet

Tabla 3. Principales componentes del SMet.

Aunque la patogénesis de los SMet y cada uno de sus componentes es compleja y no completamente aclarada, dos características parecen destacar como factores causales potenciales: resistencia a la insulina y la distribución anormal de la grasa (obesidad central). Otros factores que también han sido implicados en el desarrollo de los SMet, incluyendo el perfil genético, la inactividad física, el envejecimiento, un estado pro inflamatorio y desregulación hormonal. Se ha sugerido que el papel de estos factores causales puede variar dependiendo del grupo étnico [62], [63].

### III 2.3 Obesidad

En un estudio prospectivo se demostró que cuando el IMC llega a niveles superiores a  $35 \text{ kg/m}^2$  (definido por el  $(\text{peso}) / (\text{estatura})^2$ ), la obesidad puede favorecer el desarrollo de diversos tipos de neoplasias [34]. El Fondo de Investigación Mundial del Cáncer ha estimado, desde hace muchos años, que alrededor del 30-40% de todos los cánceres se pueden atribuir a una alimentación inadecuada, a la inactividad física y a la presencia de incremento ponderal. La obesidad ocupa el segundo lugar, inmediatamente por debajo del tabaquismo, como la causa evitable más importante asociada con la aparición de neoplasias en el ser humano.

La obesidad se define como la presencia, en un individuo, de un índice de masa corporal (IMC) mayor a  $30 \text{ kg/m}^2$ . El exceso en la adiposidad corporal, constituye uno de los mayores retos para la salud pública mundial en el naciente siglo XXI. El término de epidemia de obesidad, se ha utilizado para describir el aumento en la prevalencia de esta enfermedad desde la década de los ochenta del siglo pasado, reportando un incremento significativo durante los últimos años. En los últimos cuarenta años dicho aumento, en los Estados Unidos de Norteamérica, ha sido de aproximadamente un 50% por cada década, habiéndose doblado en las últimas tres décadas[64]. En México, el incremento ha sido similar de acuerdo con los datos estadísticos más recientes. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud del año 2012, muestran que las cifras de prevalencia combinada de sobrepeso u obesidad ( $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) es de 73% en las mujeres y de 69.4% en los hombres [65], [66].

Los cambios en la composición y en la disponibilidad de ciertos tipos de alimentos, así como la disminución en la actividad física observados en las últimas décadas, han condicionado el aumento en la prevalencia de la obesidad infantil y de los adultos durante un intervalo de tiempo relativamente corto [67]. Sin embargo, es importante reconocer la determinante contribución genética y la influencia que la misma posee sobre el peso, especialmente en un momento en que estamos empezando a identificar y comprender a aquellas moléculas que participan en el

control tanto del apetito como de la saciedad, así como a las que intervienen en la homeostasis energética, además de conocer la forma en la que la diversidad genética de las mismas puede influir en la obesidad [68].

Desde el inicio de la década de los noventa se ha demostrado que el IMC se encuentra altamente correlacionado en gemelos idénticos, aunque cada gemelo se haya desarrollado en un entorno distinto [69]. Estudios de la conducta alimentaria en padres y en gemelos idénticos sugiere que una parte importante (45%-60%) de la obesidad se debe a factores genéticos [70]. En un estudio [71] se observó que aunque no todos los niños obesos tienen padres obesos, la obesidad de sus padres es un factor importante para predecir la probabilidad de obesidad de los hijos. En este estudio también se demostró que el que los padres sean obesos aumenta a más del doble el riesgo de obesidad en los niños menores de 10 años [71]–[74].

### III. 3 Metformina

La metformina (1,1-dimetilbiguanida) es el fármaco más utilizado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [75]. Su efecto reductor de los de concentración de glucosa es una consecuencia de la disminución en la producción de glucosa hepática y el incremento de la utilización de la glucosa [76]. La historia de la metformina se remonta al uso de *Galega officinalis* (rúa de cabra o lila francesa) como medicinas botánicas para el tratamiento de poliuria en la Europa medieval [76]–[78]. La poliuria en la actualidad se reconoce como un síntoma de la diabetes no controlada. A principios de 1900, esta guanidina fue identificada como una molécula activa antidiabética, y esto llevó al desarrollo de biguanidas en la década de 1920. Sin embargo, el descubrimiento de la insulina en 1921 obstaculizó el interés en estos compuestos. Treinta años después, las dos principales biguanidas, fenformina y metformina, se sintetizaron [50]. Fenformina en forma de medicamento fue aprobado en Estados Unidos en 1957 para el tratamiento de la diabetes tipo 2, pero fue retirado de su uso clínico en la década de 1970 por presentar en sus efectos secundarios acidosis láctica. Por otra parte,



los efectos adversos inducidos por metformina no son graves, y su uso como un medicamento antidiabético se aprobó en la década de 1970 en Europa y en 1995 en los Estados Unidos [79]. Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales (Figura 4), basados en cohortes de poblaciones diabéticas y no diabéticas, y experimentos con metformina sobre líneas celulares y modelos murinos asocian a éste fármaco con la disminución en la incidencia de cáncer, así como también, con una actividad potencial anticancerígena [80].

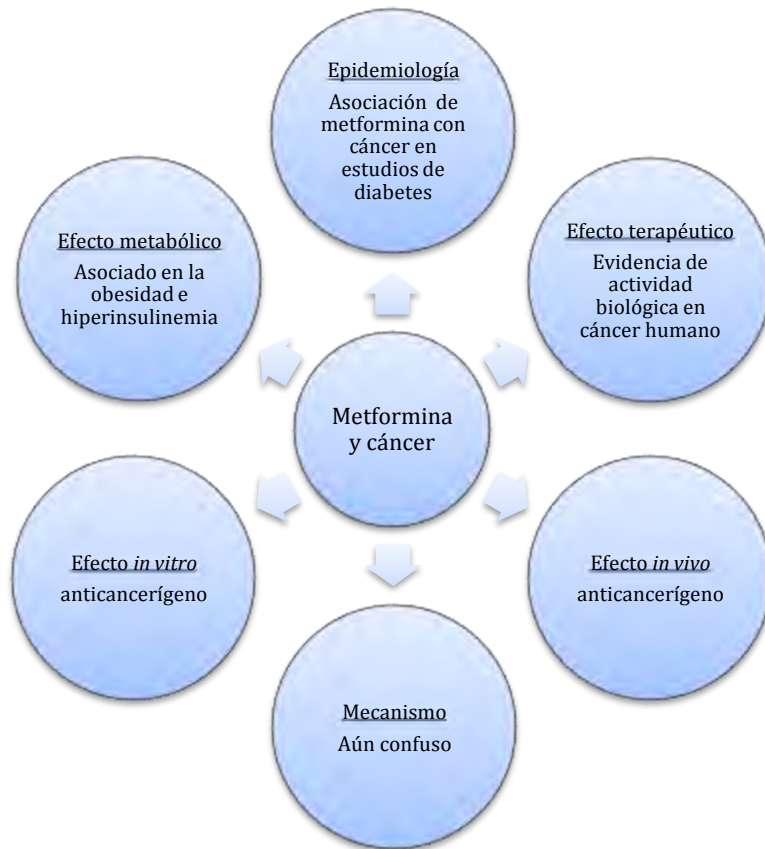


Figura 4. Principales estudios y efectos de metformina.

### **IV 3.1 Epidemiología**

Evans et al [81], fueron los primeros en reportar una posible asociación del uso de metformina con la reducción en la incidencia del cáncer. En pacientes diabéticos (62% tuvieron IMC mayor a 30) tratados con metformina durante 3 meses y no con otros hipoglucemiantes, la incidencia global de cáncer se redujo y no hubo evidencia de una respuesta a la dosis administrada, así como, en el tiempo de exposición de tratamiento. Desde entonces, al menos 17 estudios epidemiológicos que examinaron la asociación del tratamiento de metformina con la incidencia y la mortalidad por cáncer se han llevado a cabo. Todos ellos presentan la misma conclusión, metformina reduce la incidencia y mortalidad en varios tipos de cáncer hasta de un 31% [80] entre ellos, cáncer de pulmón, próstata, hepático, colón y mama. Sin embargo, muchos estudios no presentan grandes efectos, aquellos que presentan grandes efectos son en CaM y colón, esto se debe a que estos cánceres tienen un mayor riesgo de desarrollo asociado a la obesidad. Aunque exista una gran evidencia epidemiológica, todos los estudios tienen grandes limitaciones [82], estos estudios epidemiológicos retrospectivos fueron realizados bajo criterios de inclusión y exclusión propios del grupo de investigadores y no de poblaciones hospitalarias, por lo que los resultados pueden variar y tener sesgos de selección [50].

### **IV 3.2 Metformina como agente anticancerígeno**

La actividad antitumoral de metformina se asocia con los efectos directos e indirectos (Figura 5). Los efectos indirectos clásicos están vinculados a la capacidad de la metformina para inhibir la transcripción de genes involucrados en la gluconeogénesis en el hígado y de estimular la captación de glucosa en el músculo, resultando en un aumento en la sensibilidad a la insulina y con una reducción de la glucosa en sangre. Se cree que los efectos directos de la metformina pueden estar mediados principalmente por la activación de AMPK, una proteína serina / treonina quinasa implicada en la regulación del metabolismo de energía celular, conduciendo a una reducción en la señalización de mTOR y la síntesis de proteínas en las células cancerosas. La metformina activa AMPK mediante la inhibición de complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que conduce a un estado de estrés celular [83], [84]. El estrés celular incluye la privación de glucosa, hipoxia, estrés oxidativo y la isquemia, y conduce a un aumento en la proporción de AMP/ATP y la activación de AMPK [85]. El aumento resultante en AMP activa AMPK por al menos tres mecanismos separados [86]: 1) la activación alostérica, 2) la activación de la cinasa de hígado LKB1 mediante la fosforilación de su residuo Thr172 y 3) la inhibición de proteínas fosfatasas que desfosforilan a AMPK en su residuo Thr172. Tras la activación, la AMPK fosforila una serie de efectores que conducen a la activación de las vías de generación de ATP, tales como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos, y la inhibición de las vías de consumo de ATP, tales como ácidos grasos y la síntesis de proteínas [77], [87], [88].

### **IV 3.3 Efecto directo de metformina**

La síntesis de proteínas es uno de los procesos que más consumen energía en la célula y, como tal, es de suma importancia la señalización de AMPK en condiciones de estrés de energía celular (proporción baja ATP/ADP). Tras la activación por la metformina, AMPK fosforila al factor de esclerosis tuberosa (TSC2) y con esto inactiva a mTOR.

La inhibición de la señalización de mTOR conduce a una reducción en la fosforilación de sus principales efectores corriente abajo, el 4E-BP y S6K, y una inhibición de la síntesis proteica neta global [89]. La reducción de la síntesis de proteínas se cree que es un importante mecanismo de acción directo de la metformina en la inhibición de la proliferación de células cancerosas. En efecto, el efecto supresor del crecimiento de la metformina en líneas celulares de CaM se asoció con una supresión de la señalización de mTOR y una inhibición general de la síntesis de proteínas [76]. LKB1 también es un importante efecto de la sensibilidad a metformina en células tumorales. Como se indicó anteriormente, LKB1 es el activador inmediato de AMPK en respuesta al estrés por energía celular y fosforila un residuo Thr172 de AMPK importante para la actividad catalítica. Las células que carecen de LKB1 disminuyen la activación de AMPK y por lo tanto permanece activa la vía de mTOR, incluso bajo condiciones de estrés por energía celular o tratamiento con agonistas de AMPK [90]. Estudios recientes mostraron evidencia de que la activación de AMPK por metformina es llevada a cabo por LKB1. Sin embargo, existe una gran variedad de células que carecen de LKB1, incluyendo los derivados de CaM que son resistentes a los efectos inhibidores del crecimiento de la metformina *in vitro* [91][92]. Por lo tanto, LKB1 y TSC2 representan factores de gran importancia en la determinación de la sensibilidad del tumor a los efectos de la metformina. El transportador de cationes tipo I (OCT1) es el responsable para el transporte de metformina en células y polimorfismos en el gen que codifica OCT1 afectan a la captación hepática de la metformina *in vitro* y se han asociado con una disminución de la eficacia en pacientes [93]–[95].

Poco se sabe sobre la expresión de OCT1 en tumores humanos. Sin embargo, una evaluación de sus patrones de expresión en el tejido tumoral será fundamental para dilucidar el mecanismo de acción antitumoral de metformina y la identificación de los pacientes más adecuados para la terapia con metformina [96]–[99].

Informes recientes han planteado la posibilidad de que la metformina presenta efectos inhibitorios adicionales en gluconeogénesis y en la señalización de mTOR

independiente de la AMPK y TSC2 [100]–[102]. La metformina inhibe la actividad de mTOR en células que carecen de TSC2 y AMPK por la supresión de GTPasas RAG, que están implicados en la activación de mTOR[102]. Además, la metformina reduce la gluconeogénesis hepática en ausencia de AMPK, o su cinasa LKB1, mediante la reducción de los niveles de energía hepáticas. Estas observaciones generan discrepancias en el mecanismo de metformina y conducen a la necesidad de una investigación con más énfasis en el efecto indirecto de metformina. Sin embargo, parece probable que la capacidad de la metformina para ejercer efectos directos sobre la señalización de mTOR y efectos indirectos sobre la insulina circulante siguen siendo integral a su potencial mecanismo de acción en el tratamiento del cáncer [103]–[106].

#### **IV 3.4 Efecto indirecto de metformina**

Poco se sabe del efecto indirecto de metformina. Se ha reportado ser un efecto dependiente de insulina. Como se señaló anteriormente, la metformina puede presentar también efectos indirectos sobre el crecimiento del tumor mediante la reducción en la concentración de glucosa e insulina a través de la inhibición de la gluconeogénesis hepática y la estimulación de la captación de glucosa en el músculo (Figura 5). La concentración alta de insulina está asociada con la obesidad, resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 pueden promover tumorigénesis a través de la activación de la isoforma fetal de la IR-A, que está altamente expresado en el CaM humano. En conjunto, estas observaciones sugieren que, a diferencia de las células epiteliales adultas normales, las células de CaM pueden adquirir sensibilidad a los efectos de crecimiento y la supervivencia de la insulina. La reducción de la concentración de insulina por la metformina puede actuar contra esta sensibilidad al reducir la unión del ligando a IR-A / IGF1R, inhibir indirectamente el crecimiento del tumor y mejorar los resultados del CaM [90].

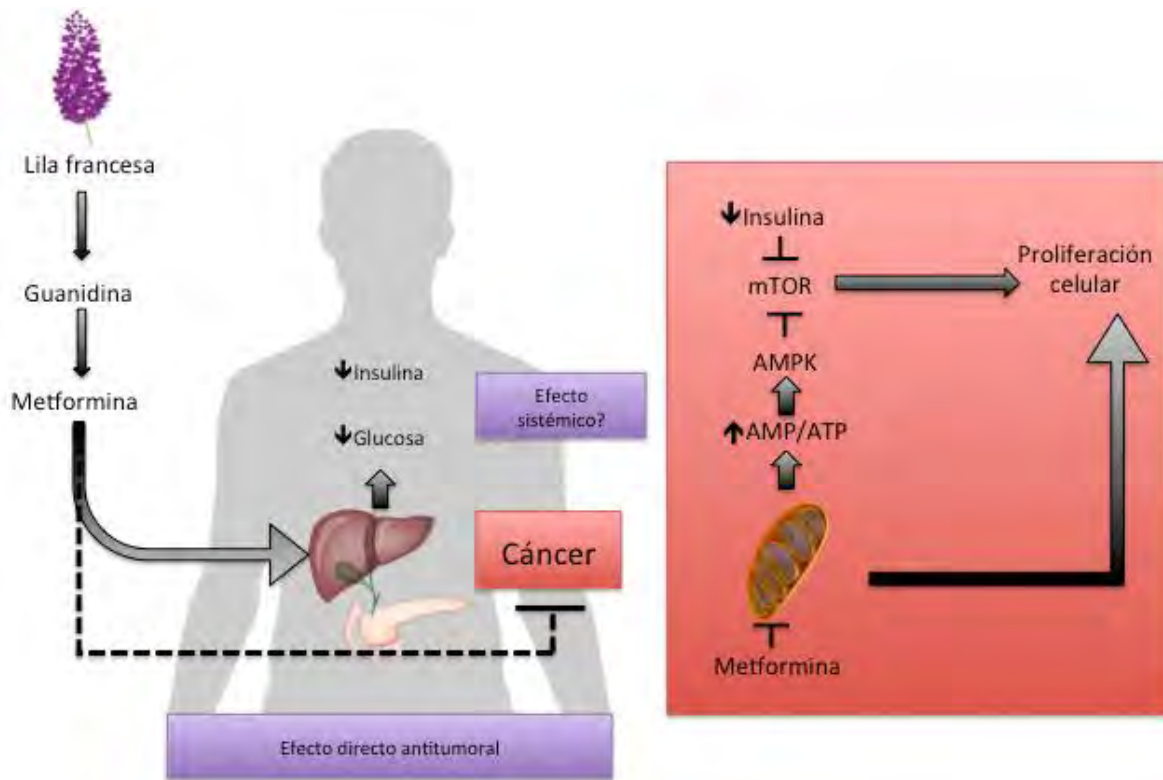


Figura 5. Principales efectos de metformina. Efecto directo e indirecto [107].

### IV 3.5 Efecto de metformina en obesidad y síndrome metabólico

Como se mencionó anteriormente la presencia de obesidad está asociado con un mayor riesgo de cáncer en general [108]. Se han postulado que metformina posee efecto en moléculas que median los factores de riesgo propios de la obesidad en el desarrollo del cáncer, incluyendo las hormonas sexuales como el estrógeno, adipocitocinas como la leptina y adiponectina, y citoquinas inflamatorias tales como las interleucinas y TNF- $\alpha$  [33], [89], [106], [109]. Recientemente, altas concentraciones de insulina en sangre en pacientes con diabetes mellitus 2 o SMet están asociadas a un alto riesgo de desarrollar cánceres en general. Por lo tanto, el efecto de metformina como sensibilizador de insulina es de importante interés y muchos médicos hoy recetan metformina como un medicamento que ayuda a bajar la concentración de insulina en sangre [110].

Teniendo como evidencia estos efectos de la metformina, el directo, el indirecto o ambos, es necesario explorar el efecto indirecto. El presente estudio tiene como base explorar el efecto indirecto de metformina a través del suero de mujeres con diferentes grados de obesidad tratadas durante 20 semanas con metformina como parte de un programa integral para la reducción de peso y concentraciones de insulina en sangre, y se propone el uso de líneas celulares como sensores de un efecto sobre la proliferación y así como también un efecto sobre la composición de citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas presentes en el suero de pacientes.

#### **IV. Antecedentes.**

En México la primera causa de muerte por tumor maligno en mujeres es el CaM. La evidencia entre la relación de la obesidad y metabolismo no regulado aumenta la incidencia de este cáncer. Varios estudios han demostrado la asociación de metformina con una disminución en la incidencia de CaM “protegiendo” a mujeres con IMC  $>30 \text{ Kg/m}^2$  frente al CaM por metformina y estudios demuestran el efecto de la metformina de manera directa en modelos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el mecanismo que ejerce metformina no es del todo claro y existen dudas si el su efecto es directo o indirecto. Con esta información, es importante analizar el efecto biológico de metformina en una manera indirecta en condiciones fisiológicas, evaluando el efecto inducido de metformina en el suero de pacientes con diferentes grado de obesidad cuantificando citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Así como también, evaluando el suero de estas pacientes mediante un ensayo de proliferación. Las células pueden funcionar como sensores biológicos ante efectos inducidos por metformina que se encuentren en el suero ha evaluar.



## **Justificación**

Existe evidencia de que la metformina es capaz de inducir un efecto de “protección” contra la incidencia del CaM en mujeres de IMC >30 Kg/m<sup>2</sup> y está este efecto no se presenta en mujeres con IMC <30Kg/m<sup>2</sup> que toman el mismo fármaco. Se puede plantear que la metformina tiene un efecto complejo en el que contribuyen efectos directos e indirectos sobre células tumorales. Entre los efectos indirectos proponemos cambios en los factores solubles presentes en el suero, resultantes de un efecto sistémico global de la metformina. Esos factores pueden incluir, hormonas, citocinas, factores de crecimiento y metabolitos. Validar el uso de líneas celulares como biosensor de los cambios de la composición sérica de pacientes mujeres con diferentes grados de obesidad y efectos en la proliferación es el objetivo de este proyecto.

## **V. Objetivos**

### **HIPÓTESIS**

En pacientes con diferentes grados de obesidad existen cambios detectables en suero de factores solubles como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, así como también, existe un efecto de muerte sobre las células tumorales de CaM *in vitro* de la línea celular MCF-7 debido al tratamiento de metformina durante 10 y 20 semanas.

### **OBJETIVOS**

#### **General**

- Analizar el efecto del suero de pacientes con distintos grados de obesidad y tratamiento con metformina por 10 y 20 semanas sobre líneas celulares de CaM.

#### **Específicos**

- a). Determinar el efecto del suero de mujeres y hombres con diferentes grados de obesidad que han recibido un tratamiento por T0, T10 y T20 semanas con metformina por medio de un ensayo de proliferación en la línea celular MCF-7.
- b). Cuantificar mediante ELISA multiplex la concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de mujeres y hombres con diferentes grados de obesidad que han recibido un tratamiento por a T0, T10 y T20 semanas con metformina.

## **VI. Materiales y Métodos**

### **Tipo y diseño del estudio**

Es un estudio prospectivo controlado, no aleatorizado con cegamiento simple, los grupos de estudio fueron tratados con medicamento activo metformina.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación en Humanos del INCMN SZ con número de referencia 1104

### **Descripción de la maniobra de intervención**

A los grupos de estudio (véase VI.3) se les administró metformina en una dosis de 1700-2550mg durante 20 semanas (2-3 tabletas de 850mg/día/individuo) y se monitoreo cada 10 semanas.

La administración de metformina siguió el siguiente esquema: La dosis del medicamento fue gradualmente aumentada a los pacientes por la mañana y noche. Se inició con 1 tableta diaria / 3 días; 2 tabletas diarias/ 3 días; 3 tabletas diarias. Para dosis de 1700mg se estableció un intervalo de 12 horas entre cada toma y cada 8 horas para una dosis 2550mg. Cuando los pacientes reportaban efectos adversos la dosis se reducía a 2 tabletas diarias que corresponde a 1770 mg/día que fue la dosis mínima incluida en este estudio.

### **Población y tamaño de muestra**

Debido que no se contaba con información sobre la frecuencia de actividad que puedan presentar los sueros, ni, las diferencias porcentuales de variación natural entre muestras de los individuos incluidos, no fue posible calcular el tamaño de la muestra. Por lo tanto, en este estudio piloto se fijó una meta de 8 mujeres y 8 hombres para cada uno de los 3 grados de obesidad por lo que se esperaba contar 48 individuos, divididos en 3 grupos según el índice de masa corporal (IMC): obesidad grado I (IMC 30 – 34.9 / 11 pacientes: 5 mujeres y 6 hombres), obesidad grado II (IMC 35 – 39.9 / 5 pacientes: 1 mujer y 4 hombres) y obesidad grado III (IMC > 40 / 11 pacientes: 7 mujeres y 4 hombres). En total 6 grupos de tratamiento. Durante el primer año del protocolo los pacientes del grupo II reportaron respuestas adversas a la metformina (nausea, cefalea y diarrea) por lo que hubo deserción y sólo se cuenta con muestras completas de 5 pacientes (1 mujer y 4 hombres). Por otro lado, dado que los pacientes con obesidad grado I

asisten con baja frecuencia a la Clínica de Obesidad y Trastornos Alimentarios del INCMNSZ, por lo cual, a lo largo de los 2 años sólo se pudieron reclutar 11 pacientes (5 mujeres y 6 hombres). Por lo anterior, aquí sólo se presentan resultados de 26.

### **Asignación de tratamiento**

Metformina para individuos con IMC mayor a 30 durante 20 semanas.

### **Grupo de estudio**

Los individuos que acudieron a Clínica de Obesidad y Trastornos Alimentarios del INCMNSZ de nuevo ingreso al Programa de Atención al Paciente Obeso (PAPO), así como los individuos que acudieron a sus visitas subsecuentes como parte del Programa Obesidad Subsecuente, que no recibieran metformina y que no padecieran diabetes. Los pacientes fueron captados desde mayo del 2014 hasta mayo del 2015.

**Mujeres:** IMC > 30 postmenopáusicas (definido por un año de amenorrea) mayores a 45 años de edad, obesidad categorizada por IMC: grado I, grado II (IMC 35>, <40) y grado III (IMC<40).

**Hombres:** IMC > 30 mayores de 40 años, obesidad categorizada por IMC: grado I, grado II (IMC 35 ≥ 40) y grado III (IMC<40).

### **Duración del seguimiento individual**

Todos los individuos tuvieron un seguimiento de 20 semanas con tratamiento.

Se realizaron tres tomas de muestra de sangre venosa: La primera antes de iniciar el tratamiento sirvió como control en este estudio y fue comparada con los efectos de las muestras a las 10 y a las 20 semanas de tratamiento.

No se controlaron fármacos concomitantes ya que el beneficio de la metformina no se ha visto afectado por otros tipos de fármacos, pero, en su caso, su empleo se registró en la base de datos.

### **Criterios de inclusión**

Todos los pacientes que participaron en el estudio cumplieron con los criterios que requieren para ingresar al Programa de Atención al Paciente Obeso (PAPO) del INCMN SZ (Ver Anexo 1)

#### Mujeres

- No haber recibido metformina en por lo menos 6 meses.
- IMC >30.
- Postmenopausia (por un año de amenorrea.)
- Edad mayor a 45 años.
- Firmar consentimiento informado (Ver Anexo 2)
- No ser diabética.

#### Hombres

- No haber recibido metformina en por lo menos 6 meses.
- IMC >30.
- Edad mayor a 40 años.
- Firmar consentimiento informado.
- No ser diabético.

### **Criterios de exclusión**

#### Mujeres

- Antecedentes de cirugía bariátrica de cualquier tipo.
- No firmar el consentimiento.
- IMC < 30 antes del tratamiento.
- Edad menor de 45 años o mayor a 70 años.
- Pre menopausia
- Padecer diabetes.
- Antecedente de enfermedad autoinmunitaria o uso de corticoesteroides u otros fármacos supresores del sistema inmunitario.

#### Hombres

- Antecedentes de cirugía bariátrica de cualquier tipo.
- No firmar el consentimiento.
- IMC < 30 antes del tratamiento.
- Edad menor de 40 años o > 70 años.
- Padecer diabetes.
- Antecedente de enfermedad autoinmunitaria o uso de corticoesteroides u otros fármacos supresores del sistema inmunitario.

### **Criterios de eliminación**

- Disminución de peso en un 10% o mayor al finalizar el estudio.
- Cirugía bariátrica de cualquier tipo durante el estudio.
- No seguir el tratamiento durante las 20 semanas de forma adecuada.
- No tolerar la dosis mínima de 1700 mg de metformina por día (2 tabletas diarias).

### **Variables evaluadas**

<b>Variable</b>	<b>Valores</b>
<b>Edad</b> Años desde el nacimiento.	Edad en años
<b>Peso</b> Número de kilogramos que pesa al ingreso y final del estudio.	Peso en kilogramos (Kg)
<b>Índice de Masa Corporal (IMC)</b> Índice para establecer el grado de obesidad, se obtiene al dividir el peso entre la talla al cuadrado al ingreso y final del estudio.	Peso entre kilogramo al cuadrado (kg/m <sup>2</sup> )
<b>Talla</b> Estatura medida con la persona de pie y sin zapatos usando estadímetro.	Metros (m)
<b>Glucosa</b> Concentración de glucosa plasmática después de 8 horas de ayuno	Concentración (mg/dL)
<b>Insulina</b> Concentración de insulina plasmática después de 8 horas de ayuno	Concentración (mg/dL)
<b>HOMA-IR</b> Índice de resistencia a la insulina que se obtiene al multiplicar glucosa por insulina dividido entre 405	Numero continuo
<b>Colesterol LDL</b> Colesterol de baja densidad en el plasma sanguíneo	Concentración (mg/dL)
<b>Colesterol HDL</b> Colesterol de alta densidad en el plasma sanguíneo colesterol de baja densidad en el plasma sanguíneo	Concentración (mg/dL)
<b>Triglicéridos</b> Triglicéridos contenidos en el plasma sanguíneo	Concentración (mg/dL)

## **Información Adicional**

También registró el uso de otros fármacos y complementos empleados por los pacientes durante el estudio que incluyeron: vitamina D, beta bloqueadores, diuréticos, anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), bloqueadores enzimáticos IECAS y complementos vitamínicos.

Para la determinación de los parámetros metabólicos basales de los individuos se realizaron estudios de laboratorio solicitados antes de la primera consulta de ingreso al Programa de Atención al Paciente Obeso (PAPO) o antes de su visita dentro del Programa de Obesidad Subsecuente. Se solicitó que los estudios hubieran sido realizados dentro de los últimos 6 meses.

Para estudiar el efecto sistémico de metformina en pacientes se obtuvo suero de sangre venosa después de 10 y 20 semanas de tratamiento. Los pacientes fueron citados tres veces a consulta con el equipo clínico del estudio; una para la inclusión, tomar medidas antropométricas y la entrega de medicamento para las primeras 10 semanas de tratamiento. La segunda cita fue para el primer seguimiento del tratamiento, fueron contadas las tabletas para un control del apego al tratamiento de cada paciente, se tomaron medidas antropométricas y se entregó la segunda cantidad de metformina para las siguientes 10 semanas. La tercera cita fue para el segundo

### **Protocolo para la extracción de suero humano**

#### **Suero**

Se emplearon tubos con separador de suero de tapa roja con gris (BD # 367988 de 8.5 mL).

**Procedimiento:** Después de realizar la punción venosa en el consultorio de la Clínica de Obesidad y Trastornos Alimentarios los tubos se mantuvieron en forma vertical. Las muestras se llevaron al laboratorio de la Unidad de Bioquímica dónde se permitió la coagulación incubando durante 30 min a temperatura ambiente. Al término de este periodo los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 25 min. El suero

se repartió en 6 alícuotas de 1 ml cada una en tubos previamente marcados con la fecha, género, grado de obesidad, número de toma y número de paciente. Ejemplo: (25052015 M/II/1/06) muestra tomada el 25 de mayo del 2015 a una mujer con obesidad grado II correspondiente a la primera toma antes de recibir metformina, paciente No 6 en el reclutamiento consecutivo registrado en la base de datos. Cada alícuota se almacenó a -70 °C hasta antes de ser empelada. Para su uso cada alícuota se descongelaron en un baño de hielo a 4 °C. Las muestras lipémicas se centrifugaron a 4 °C a 10,000 rpm por 5 min en la micro centrifuga a 9,300g (Micromax, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Con este procedimiento los lípidos quedan adheridos a la pared del tubo y el suero se colecta con cuidado de no mezclarlo con los lípidos de las paredes. Este suero se usó en todos los ensayos realizados. Se observó que la actividad citotóxica se perdía después de 2 ciclos de congelación (ver Anexo 3), por lo que el suero remanente de la primera descongelación se congeló sólo una segunda vez y después se descartó. Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar (Biological Safety Cabinet Class Type A2, UN AIRE, Plymouth MN, EUA) para mantener la esterilidad del suero.

### **Ensayo de proliferación**

Se evaluó el efecto de los sueros sobre la proliferación de las células humanas de adenocarcinoma de mama MCF-7 con fenotipo luminal que se adquirieron del ATCC (ATCC-HTB-22). Las células MCF-7 se expandieron en cajas Petri de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio de crecimiento con Medio RPMI-1640 (GIBCO 31800-022) suplementado con suero bovino fetal al 10%, (Biowest, CAT S1810). Todos los cultivos de células se mantuvieron siempre a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% saturada con H<sub>2</sub>O en una incubadora (NU AIRE US Autoflow, Plymouth MN, EUA). Tres días antes de iniciar el experimento se sembraron 15,000 células MCF-7/m<sup>2</sup> en una placa de 48 pozos con medio de crecimiento. Después de las primeras 24 h se reemplazó el medio con RPMI-1640 (GIBCO CAT 23400) suplementado con suero bovino fetal al 2% y antibiótico y antimicótico y los



cultivos se mantuvieron por toda la noche en la incubadora. El tercer día se reemplazó el medio con RPMI-1640 sin rojo de fenol (GIBCO CAT 11835030) carente de suero bovino fetal y se incubó por 4 h. Al final de esta incubación se reemplazó el medio con RPMI-1640 sin rojo de fenol suplementado al 5% con los sueros de mujeres y hombres en la línea celular derivada de CaM MCF-7 por el ensayo de proliferación con cristal violeta (Anexo 4). También se probó el efecto de metformina (Sigma-Aldrich CAT PHR1084) añadida a los sueros de mujeres y hombres a concentración de 5mM en la línea celular MCF-7 por el ensayo de proliferación con cristal violeta.

**Controles:** INS: medio de cultivo RPMI sin rojo de fenol suplementado al 5% de SBF, con antibiótico y antimicótico, y 0.5U/mL de insulina recombinante humana (PiSa CAT 1051). SFB: medio de cultivo RPMI sin rojo de fenol suplementado con antibiótico y antimicótico y suero bovino fetal al 5%. SHc: medio de cultivo RPMI sin rojo de fenol suplementado con antibiótico y antimicótico suplementado con 5% de suero humano de un individuo normal (sin obesidad y < 45 años HOMA<3). En todos los ensayos con pacientes femeninas se empleó una alícuota recién descongelada de suero de la misma mujer. En todos los ensayos con pacientes masculinos se empleó una alícuota recién descongelada de suero del mismo hombre.

**Control negativo:** medio de cultivo RPMI 1640 sin suplementar.

Los sueros de pacientes con 0, 10 y 20 semanas de tratamiento con metformina se analizaron al suplementar el medio con 5% de suero de cada paciente. También se probó la capacidad del efecto de una solución de metformina a 5mM añadida de forma adicional a cada uno de los sueros tanto de individuo normal como los sueros de pacientes.

**Basal:** Para contar con un registro del número de células al inicio del ensayo se emplearon tres pozos para fijar con 100 µl/pozo de una solución de glutaraldehído al 1.1% V/V con medio al 2.5% de SBF justo antes de añadir los sueros de los pacientes. Después de 30 min de fijación a temperatura ambiente la solución con glutaraldehído se cambió por medio RPMI con rojo de fenol suplementado con

antibiótico y antimicótico sin suero. Estos pozos se tiñeron al momento de teñir el resto de los pozos al final de ensayo.

### **ELISA Bio-PLEX**

El sistema de matriz de suspensión Bio-Plex (Millipore) es un inmunoensayo basado en microesferas, que utiliza perlas Luminex™ acoplados a anticuerpos específicos, como una plataforma de captura de analito. En total, 100 micro litros de sueros sujetos a ensayo fueron utilizados para detectar el contenido de factores analizados. Las muestras se añadieron por duplicado a placas de 96 pocillos que contenían perlas de poliestireno del kit de ensayo de 27-analitos. Después de incubar, las perlas lavaron dos veces con el tampón Bio-Plex de lavado reteniéndolas por medio de un filtro usando un colector de vacío (Millipore, Bedford, MA). Se preparó un estándar para cada una de los 27 analitos humanas en un rango de concentraciones de 0.2 a 32,000 pg/mL y se añadieron a las perlas con anticuerpo conjugado. Las placas con las perlas y los sueros y los estándares se incubaron en la oscuridad en un agitador de plataforma durante 30 min. Después de la incubación se eliminaron las soluciones con los sueros y los estándares se mediante vacío, y nuevamente, las perlas se lavaron tres veces con tampón de lavado Bio-Plex reteniéndose por filtración. Después, a las perlas lavadas se añadió una dilución 1:50 de anticuerpo de detección biotinilado, seguido de incubación en la oscuridad en un agitador de plataforma durante 30 min. Una vez más, Las perlas se lavaron tres veces y se incubaron con una dilución 1:100 de estreptavidina-ficoeritrina (PE) durante 10 min. Las perlas se lavaron tres veces como se describió anteriormente, se re suspendieron en buffer de ensayo Bio-Plex, y se analizaron en un lector de placas Bio-Plex.

### **Análisis estadístico**

Todos los experimentos excepto las mediciones por multiplex que se realizaron por duplicado se realizaron por triplicado en al menos tres experimentos independientes por lo que la “n” es al menos de 3. Los datos se expresaron como promedio  $\pm$  DE y porcentajes. Para variables continuas, se utilizó un análisis de t pareada para evaluar los cambios intragrupo e intergrupo. Para el ensayo de

proliferación se utilizó Prueba Kruskal-Wallis (ANOVA para muestras no paramétricas), con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## **VII. RESULTADOS**

### **VIII. 1 Población**

Veintiséis individuos de los cuarenta y ocho esperados en el diseño inicial del proyecto completaron las 20 semanas de tratamiento con metformina en el periodo comprendido de mayo del 2014 a junio del 2015, la media de edad fue de 58 años para mujeres y de 53 para hombres. Para cada individuo que ingresó al protocolo se registraron los datos antropométricos y los valores bioquímicos séricos antes de empezar el tratamiento con metformina, pero no se registraron los mismos datos a las 10 y 20 semanas, debido a que no era parte del protocolo del PAPO de la Clínica de Obesidad del INCMNSZ (Tabla 5). En promedio los individuos de los tres grupos de la población total perdieron peso (- 9.89%). Sin embargo, hubo una paciente con IMC > 30 Kg/m<sup>2</sup> que mantuvo su peso individuo #15, Anexo V) y un hombre que ganó peso individuo #4, Anexo V). En el Anexo V, se presenta la tabla de números de identidad de cada uno de los individuos que participaron en el estudio, así como los pesos y los IMC después de las 20 semanas de tratamiento.

Veinte de los veintiséis individuos que corresponde al 77 % de lo población total (38.5% mujeres y 38.5 % hombres) presentan más de 3 factores del SMet según la OMS/ATP III. Se obtuvieron datos objetivos de glucosa sérica en ayunas e insulina sérica basal de 16 participantes que tuvieron 3 o más factores del SMet. También se calculó el índice de resistencia a la insulina (HOMA2-IR) para todos los participantes. El 50% (25% mujeres y 25% hombres) tuvo HOMA mayores 3.00 y el otro 50% tuvo valores de HOMA iguales o menores 3.00.

#### **Obesidad Grado I**

Para este subgrupo de la cohorte se contó con 10 individuos (5 mujeres y 5 hombres). Una paciente (individuo #2) presenta, 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00, las restantes cuatro individuos se dividieron en; tres mujeres con 3 o más factores del SMet y HOMA<3.00 (individuos # 1,3,4) y una mujer con menos de 3 factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #5). Por otra parte, los cinco

hombres de este subgrupo (individuos # 6, 7, 8, 9 y 10) no poseen más de 3 factores del SMet y el valor de HOMA está por debajo de 3.00.

### **Obesidad grado II**

A este subgrupo ingresaron solo 6 individuos (2 mujeres y 4 hombres), una paciente con menos de 3 factores del SMet y HOMA<3.00 y cuatro hombres uno con menos de 3 factores del SMet, y los otros tres con 3 o más factores del SMet y HOMA<3.00. Este subgrupo presentó un elevado índice de deserción por presentar con agudeza los efectos secundarios de la toma de metformina y por lo tanto no se analizó este subgrupo (cefalea, diarrea, náuseas y vómito).

### **Obesidad Grado III**

Este subgrupo fue el de mayor frecuencia en la clínica. Dado a que en este grupo el IMC está por arriba de 40 estos individuos presentan múltiples comorbilidades como hipertensión, dislipidemias y resistencia a los carbohidratos. Este subgrupo cuenta con once individuos (7 mujeres y 4 hombres), tres mujeres poseen 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuos #14, 17 y 18). De las otras cuatro mujeres, dos presentan 3 o más factores del SMet y HOMA<3.00 (individuos #12 y 15), y dos más no tienen registros de glucosa e insulina (individuos #13 y 16). Los cuatro hombres presentan 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuos #19, 20, 21 y 22). Ver Anexo V.

Variable	Población total		Obesidad GI		Obesidad GII		Obesidad GIII	
	n = 26		n = 10		n = 5		n = 11	
	Mujeres (n=13)	Hombres (n=13)	Mujeres (n=5)	Hombres (n=5)	(n=1) Mujeres	Hombres (n=4)	Mujeres (n=7)	Hombres (n=4)
<b>Edad (años)</b>	57.69 (±6.23)	53.15 (±7.33)	59.60 (±8.41)	55.20 (±8.01)	61	53.00 (±10.03)	55.85 (±4.67)	50.75 (±3.77)
<b>Talla (m)</b>	1.53 (±0.07)	1.70 (±0.07)	1.56 (±0.08)	1.73 (±0.06)	1.54	1.75 (±0.04)	1.50 (±0.07)	1.62 (±0.01)
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>								
<b>Inicial</b>	40.17 (±6.97)	38.57 (±7.17)	33.10 (±1.49)	31.99 (±1.31)	36.13	37.81 (±2.07)	45.80 (±3.81)	47.56 (±4.31)
<b>Final</b>	38.14 (±7.02)	37.37 (±6.75)	31.12 (±1.41)	30.35 (±1.22)	33.98	38.67 (±3.58)	43.75 (±4.08)	44.83 (±2.99)
<b>% cambio de peso</b>	-5.18(±2.60)	-3.01 (±4.56)	-5.97(±1.88)	-5.10 (±1.40)	-5.95	-2.15(±4.37)	-4.50 (±3.16)	-5.56 (±3.18)
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	91.61 (±6.83)	93.46(±9.40)	93.80 (±2.58)	92.20(±9.73)	83	96.25(±3.77)	91.28 (±8.51)	92.25 (±14.08)
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	142.23 (±61.08)	146.23(±59.97)	190.80 (±71.15)	147.40(±85.65)	77	141.5(±63.19)	116.85 (±25.71)	149.50 (±23.81)
<b>Colesterol (mg/dL)</b>								
<b>HDL (mg/dL)</b>	47.53 (±12.95)	40.61 (±7.18)	42.40 (±9.60)	40.20 (±3.03)	69*	38.75 (±4.71)*	48.14 (±13.22)	43 (±12.62)
<b>LDL</b>	119.76 (±27.25)	119.53 (±31.42)	122.80 (±36.67)	114.00 (±24.47)	111	118.25 (±42.22)	118.85 (±23.83)	127.75 (±34.99)
<b>HOMA-IR</b>	2.72 (±1.75)	3.09 (±2.16)	2.41 (±1.09)	1.65 (±0.31)	0.71	1.72 (±0.11)	3.44 (±2.17)	4.86 (±2.23)

**Tabla 5.** Características antropométricas y mediciones bioquímicas séricas en población total y en los subgrupos ordenados por grado de obesidad. HOMA-IR: modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina, LDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

Condición metabólica	Obesidad grado I n=10	Obesidad grado III n=11
<b>Mujeres</b>		
> 3 factores SMet HOMA>3.00 n=4	n=1 (#2:H, R, D) EM	n=3 (#14: N, SR, D) (#17: N, R, SD) EM (#18: N, R, D)
> 3 factores SMet HOMA<3.00	n=3 (#1: N, D, R) (#3:H, SR, D) (#4: H, SR, D)	n=2 (#12:H, R, SD) (#15:H, SR, D) EM
< 3 factores SMet HOMA<3.00	n=1 (#5:H, D, R) EM	(#13: N) * (#16: H) *
<b>Hombres</b>		
> 3 factores SMet HOMA>3.00	n=1 (#9: N, SR, SD)	n=4 (#19:H, R, SD) (#20:H, SR, D) EM (#21:H, R, SD) (#22:H, R, SD)
> 3 factores SMet HOMA<3.00	0	0
< 3 factores SMet HOMA<3.00	n=4 (#6: N, SR, D) (#7: N, SR, D) EM (#8: N SR, D)	0

**Tabla 6.** Subgrupos divididos por número de factores del SMet y valor de HOMA > o < a 3.00. La clave de individuo indica: H: Hipertenso, **N**: Normo tenso; **R**: Con resistencia a carbohidratos, **SR**: sin resistencia a carbohidratos; **D**: Dislipidemia, **SD**: Sin dislipidemia, **EM**: Estudio de ELISA Multiplex realizado. \*: Sin datos de glucosa e insulina. #: Numero de identidad de cada individuo de acuerdo a la tabla del Anexo IV.

### **VIII. 3 Elisa multiplex**

Se realizó un análisis preliminar de algunos de los sueros de mujeres y hombres mediante el arreglo de citocinas medidas por la técnica de ELISA xMAP (Millipore). Las citocinas analizadas para individuos de obesidad grado I y III fueron: *VEGF-A, IL-6, TNF-alfa, IL-1beta, IL-12p(40), IL-7, IL-2, Eotaxina, IP-10, MCP-1, MIP-1, MIP-1b, IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, CTACK, GROa, HGF, INF-alfa2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, b-NFG, SCF, SCGF-beta, SDF-1, TNF-beta y TRAIL*, agrupadas en citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Debido a limitaciones en equipo y consumibles para el ensayo, solo se analizó un individuo por cada condición. La concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se analizaron por duplicado y en las tablas del Anexo VI y VII se muestra el promedio de estas dos mediciones.

Los resultados de la concentración de citocinas y quimiocinas varían dependiendo del perfil metabólico de cada individuo. Solo 5 de los 32 analitos, VEGF-A, IL-1beta, IL-2, TNF-alfa y Eotaxina mostraron diferencia y por lo tanto solo se presentan estos resultados. Se observó una disminución en varias citocinas y quimiocinas durante el período del tratamiento. La concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se reportan en pg/mL y fueron normalizados con los valores de individuos con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup> tanto en mujeres como hombres, para obtener veces de cambio.

#### **Obesidad grado I**

Se analizaron las muestras correspondientes a T0, T10 y T20 de 3 individuos (#2, 5 y 7). Una mujer del subgrupo con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #2), de una mujer del grupo con menos de 3 factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #5) y de un hombre del grupo con menos de 3 factores del SMet y HOMA<3.00 (individuo #7). Las citocinas y factores de crecimiento con cambio después del tratamiento con metformina se presentan a continuación:

#### **IL-1 $\beta$**

Para la mujer con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #2) la concentración de IL-1 $\beta$  antes de empezar el tratamiento con metformina (T0) fue



12 veces mayor a la concentración del individuo sano con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$  (16.6 pg/mL vs 1.4 pg/mL). A las 10 semanas de tratamiento (T10) la concentración de IL-1 $\beta$  disminuyó 40% comparado con T0 (10.00 pg/mL vs 16.6 pg/mL) y para las 20 semanas de tratamiento (T20) la concentración de esta citocina disminuyó 5% más (10.0 pg/mL vs 9.00 pg/mL) comparado con T0. Por otra parte, en la mujer con menos de 3 factores del SMet y  $HOMA > 3.00$  (individuo #5), y en el hombre (individuo #7), la concentración de IL-1 $\beta$  beta se mantuvo constante y de igual magnitud a la concentración de los individuos con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$ . Esto sugiere que la obesidad no afecta la concentración de esta citocina y el cambio es debido a la metformina. (Figura 6, panel A).

### **IL-2**

La concentración de IL-2, en la mujer con 3 o más factores del SMet y  $HOMA > 3.00$  (individuo #2) antes de empezar el tratamiento (T0) fue de 5.5 veces mayor a la de la mujer con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$  (10.0 pg/mL vs 1.8 pg/mL), después de 10 semanas de tratamiento (T10) la concentración de IL-2 disminuyó 4.5 veces en comparación con T0 (10.0 pg/mL vs 1.8 pg/mL) con una concentración semejante a la de la mujer con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$  (1.8 pg/mL) y a la semana 20 (T20), la concentración de IL-2 ya no cambió (1.8 pg/mL). Para la mujer con más de 3 factores del SMet y  $HOMA < 3.00$  (individuo #5) y el hombre (individuo #7) con menos de 3 factores del SMet y  $HOMA < 3.00$ , no se observó ninguna variación en la concentración de IL-2. Esta permaneció constante (1.8 pg/mL) y de igual magnitud que en los individuos con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$  (Figura 6, panel B).

### **VEGF-A**

En el suero de la mujer con más de 3 factores del SMet y  $HOMA > 3.00$  (individuo #2) la concentración de VEGF-A aumentó 3 veces (3pg/mL) solo hasta las 20 semanas de tratamiento (T20) en comparación T0 y T10 (1.2 pg/mL vs 1.2 pg/mL). En la mujer con 3 o más factores del SMet y  $HOMA < 3.00$  (individuo #5) no se encontró ninguna alteración en la concentración de este factor de crecimiento, que se mantuvo constante con respecto al individuo con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$ . Por otra parte, para el hombre (individuo #7) con menos de 3 factores del SMet y  $HOMA < 3.00$  se observó que antes del tratamiento T0, la concentración de VEGF-A fue de 13 veces mayor que los del individuo con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$  (673 pg/mL vs 53.4 pg/mL).

A las 10 semanas de tratamiento (T10) la concentración de VEGF-A disminuyó 40% en comparación con T0 (674 pg/mL vs 350 pg/mL) y permaneció constante a las 20 semanas de tratamiento (350 pg/mL) (Figura 7).

### **Obesidad grado III**

En este grupo de pacientes se analizaron las muestras correspondientes a T0, T10 y T20 de 3 individuos (#17, 15 y 20). Una mujer con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #17), una mujer con 3 o más factores del SMet y HOMA<3.00 (individuo #15) y un hombre con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #20). Las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en donde se encontró diferencia fueron las siguientes:

### **TNF- $\alpha$**

La concentración de TNF-alfa en la mujer con de 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #17) antes de iniciar el tratamiento (T0) fue de 3.5 veces mayor que la de la mujer con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup> (25.00 pg/mL vs 7.1 pg/mL). A las 10 semanas de tratamiento (T10) la concentración de TNF- $\alpha$  disminuyó un 44% en comparación con T0 (25.0 pg/mL vs 14 pg/mL) y a las 20 semanas la concentración TNF- $\alpha$  ya no cambió y se mantuvo en 14 pg/mL. Para la mujer con las mismas condiciones del SMet, pero con HOMA<3.00 (individuo #15) se observó un fenómeno semejante. Antes de iniciar el tratamiento (T0) la concentración de TNF- $\alpha$  fue de 3 veces mayor (22 pg/mL) comparados con la mujer con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup>, a las 10 semanas de tratamiento la concentración de esta citocina disminuyó 22% (16.8 pg/mL) comparada con T0 y a las 20 semanas disminuyó en un 32% con respecto a T0 para llegar a una concentración de 14 pg/mL. Esta concentración coincide con los niveles que observamos en la mujer con las mismas características de clasificación del SMet, pero con HOMA>3.00 (individuo #15). Por otra parte, en el hombre con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #20), los niveles séricos de TNF-alfa fueron 1.1 veces mayores a los del hombre con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup>. El tratamiento con metformina no alteró éstos niveles significativamente (Figura 8).

### **Eotaxina-1 (CCL11)**

La concentración de esta quimiocina mostró incrementos de menor magnitud observados en los 5 analitos que presentaron cambios. En a la mujer con 3 o más factores del SMet y con HOMA>3.00 (individuo #15), la concentración a T0 fue 0.5 veces mayor con respecto a los niveles en la mujer con IMC<30 Kg/mm<sup>2</sup>. A las 10 semanas (T10) disminuyó 16% (101 pg/mL) con respecto a T0 y a las 20 semanas (T20) aumentó un 30% (156 pg/ mL) con respecto a T0.

En la paciente con 3 o más factores del SMet y HOMA<3.00 (individuo #17) se detectó un incremento de 0.5 veces en la concentración de Eotaxina comparada con la concentración de la mujer con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup> (120 pg/mL vs 78.9pg/mL), a las 10 semanas de tratamiento (T10) la concentración disminuyó a los niveles basales y a las 20 semanas (T20) la concentración disminuyó a niveles semejante a los de la mujer con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup> (52.4 pg/mL vs 78.9 pg/mL. Interesantemente, el hombre con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #20) presentó un aumento de 3.46 veces con respecto al hombre con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup> (269.8 pg / mL), y la concentración se mantuvo igual después de 10 semanas de tratamiento (T10). A las 20 semanas de tratamiento (T20) la concentración disminuyó 2.9 veces en comparación de T0 y T10, cayendo por debajo de los niveles del individuo con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup> (39.5 pg /mL) (Figura 9).

### **VEGF-A.**

La concentración de este factor de crecimiento solo reportó diferencia en la mujer con 3 o más factores del SMet y HOMA<3.00 (individuo #17) y el hombre con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 (individuo #20). Para la mujer con 3 o más factores del SMet y HOMA<3.00 (individuo #17), la concentración de VEGF-A antes de iniciar el tratamiento (T0) fue 4.3 veces mayores que los de la mujer con IMC<30 Kg/m<sup>2</sup> (226.0 pg/mL vs 52.4 pg/mL), a las 10 semanas de tratamiento esta concentración disminuyó 77% en comparación con T0 (221.0 pg/mL vs 52.4 pg/mL) y a las 20 semanas se mantuvo en los mismos niveles (54.2 pg/mL). En la mujer con 3 o más factores del SMet y HOMA<3.00 la concentración de VEGF-A

fue semejante a los niveles de la mujer con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$ . El tratamiento con metformina no mostró ningún efecto. Estos resultados indican que metformina reduce la concentración de VEGF-A. Por otra parte, el hombre con 3 o más factores del SMet y  $HOMA < 3.00$  (individuo #20) presentó un comportamiento semejante aumentando 4.3 veces la concentración para T0, en comparación con la concentración del hombre con  $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$  (221 pg/mL vs 52.4 pg/mL), a las 10 semanas de tratamiento (T10) la concentración disminuyó 40% en comparación con T0 (221 pg/mL vs 120.52 pg/mL) y a las 20 semanas del tratamiento (T20) la concentración disminuyó 54% comparado con los niveles reportado en T0 (120.52 pg/mL vs 106.8 pg/mL) (Figura 10).

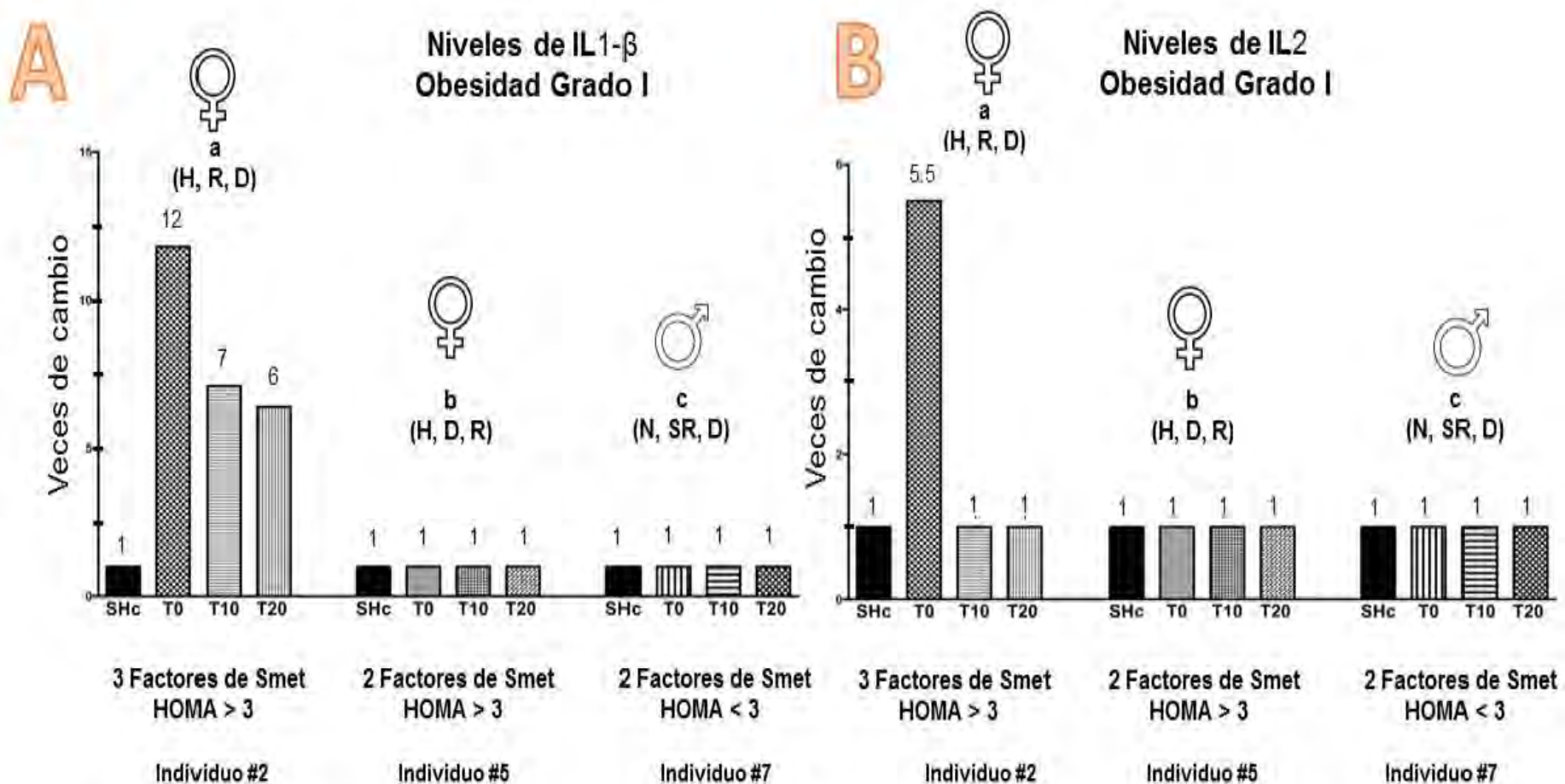


Figura 6. Los niveles de IL-1β(A) e IL-2(B) presentes en suero de mujeres con obesidad grado I con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 disminuyen después del tratamiento con metformina. Detección de citocinas por medio de ELISA xMAP. Los valores se expresan en veces de cambio normalizados con los niveles de IL-1β e IL-2 provenientes de un individuo con IMC<30 Kg/cm<sup>2</sup>. Se presenta en cada histograma los niveles de a) paciente con 3 factores del SMet y HOMA >3.00 comparados con b) paciente con 2 factores del SMet y HOMA > 3.00 y c) hombre con 2 factores del SMet y HOMA < 3.00. T=0 antes de iniciar el tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento. Los números encima de cada barra indican las veces de cambio con respecto al SHc, individuo con IMC< 30 Kg/cm<sup>2</sup>. La clave de cada individuo corresponde con la de la tabla del Anexo V

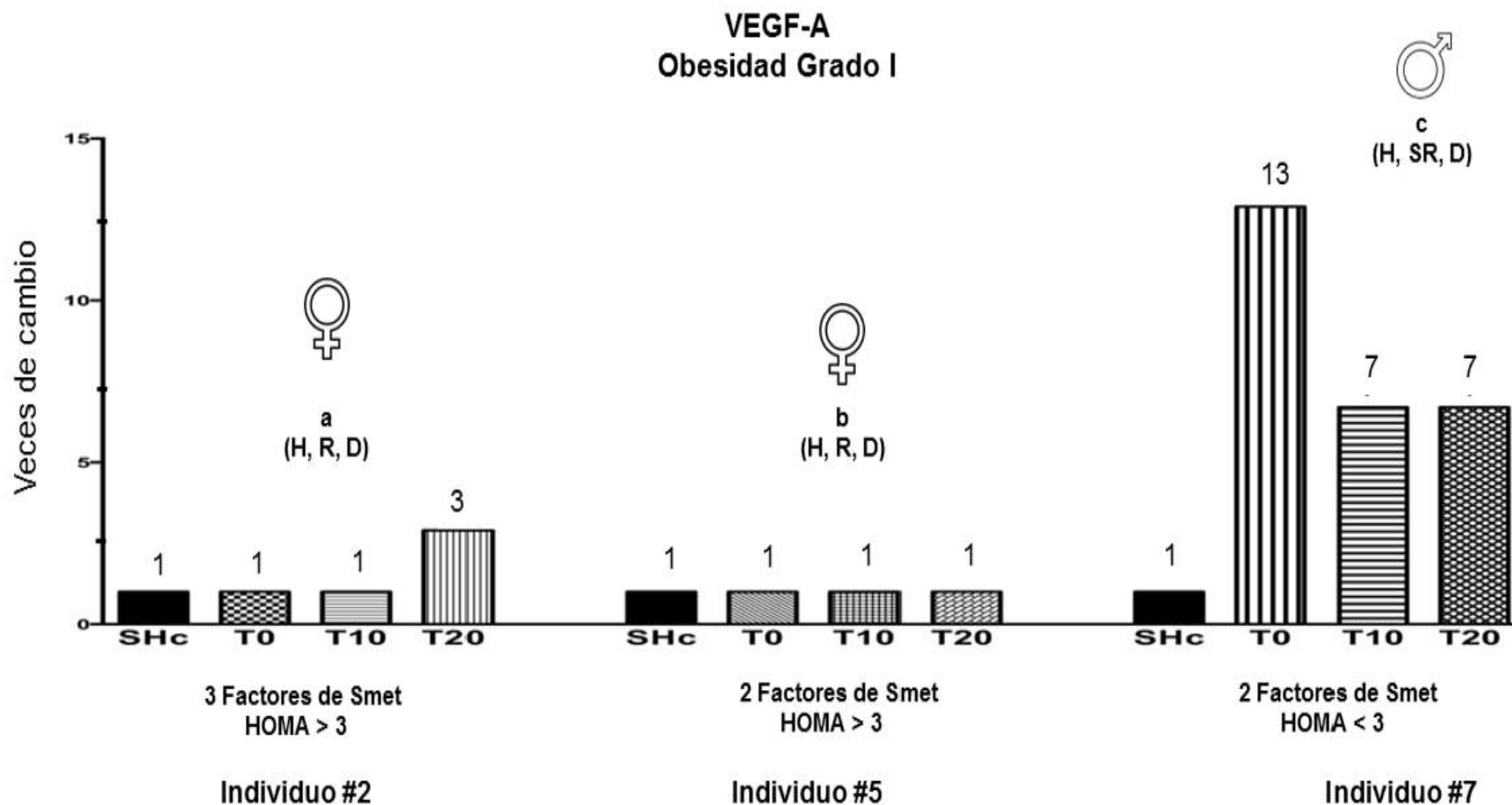


Figura 7. Los niveles de VEGF presentes en suero de mujeres con obesidad grado I con 3 o mas factores del SMet y HOMA>3.00 aumentan después de 20 semanas de tratamiento con metformina. Detección de VEGFG por medio de ELISA xMAP. Los valores se expresan en veces de cambio normalizados con los niveles de citocinas provenientes de un individuo con IMC<3.00 Kg/cm<sup>2</sup>. Se presenta en cada histograma los niveles de a) paciente con 3 o más factores del SMet y HOMA >3.00 comparados con b) paciente con 2 factores del SMet y HOMA > 3.00 y c) hombre con 2 factores del SMet y HOMA < 3.00. T=0 antes de iniciar el tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento. Los números encima de cada barra indican las veces de cambio con respecto al SHC, individuo con IMC< 30 Kg/cm<sup>2</sup>.La clave de cada individuo corresponde con la de la tabla del Anexo V.

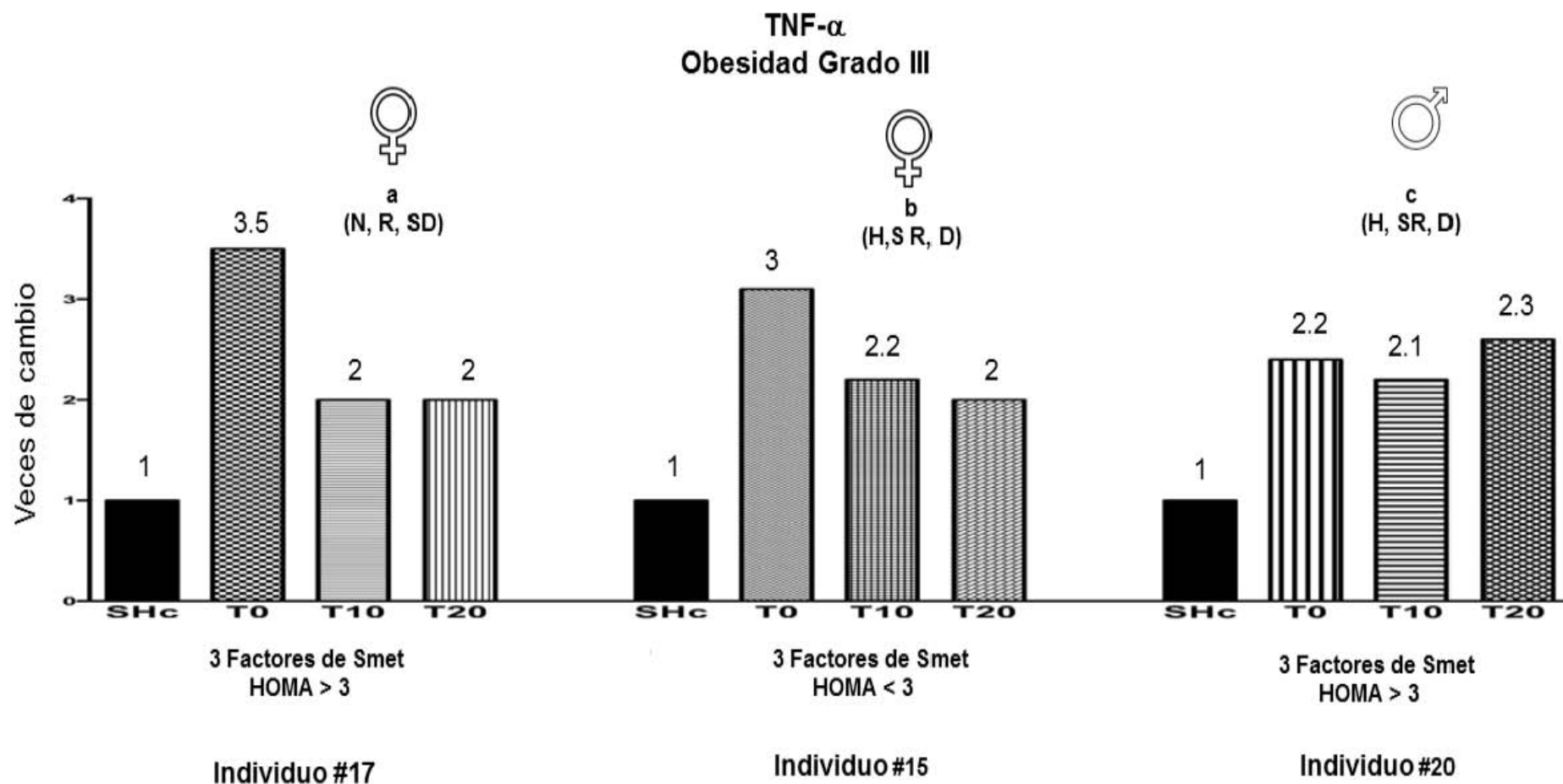


Figura 8 Los niveles de TNF- $\alpha$  presentes en suero de mujeres de obesidad grado III con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 disminuyen después de 10 semanas tratamiento con metformina. Detección de citocinas por medio de ELISA xMAP. Los valores se expresan en veces de cambio normalizados con los niveles de TNF- $\alpha$  provenientes de un individuo con IMC<3.00 Kg/cm<sup>2</sup>. Se presenta en cada histograma los niveles de a) paciente con 3 o más factores del SMet y HOMA >3.00 comparados con b) paciente con 2 factores del SMet y HOMA > 3.00 y c) hombre con 2 factores del SMet y HOMA < 3.00. T=0 antes de iniciar el tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento. Los números encima de cada barra indican las veces de cambio con respecto al SHC, individuo con IMC< 30 Kg/cm<sup>2</sup>. La clave de cada individuo corresponde con la de la tabla del Anexo V.

Niveles de Eotaxina  
Obesidad Grado III

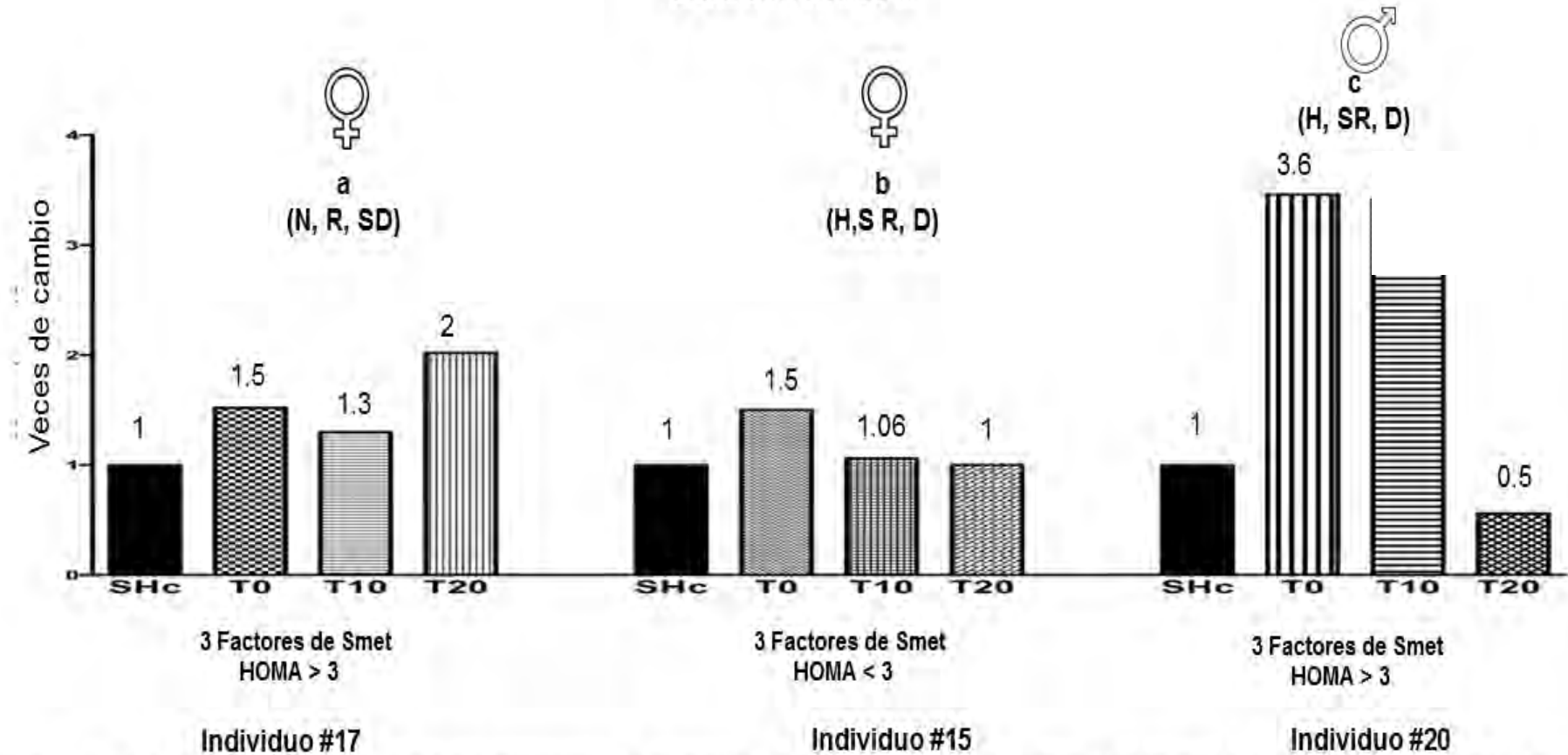


Figura 9. Los niveles de Eotaxina (CCL11) presentes en suero de hombres con obesidad grado III con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 disminuyen después de 20 semanas tratamiento con metformina. Detección de quimiocinas por medio de ELISA xMAP. Los valores se expresan en veces de cambio normalizados con los niveles de Eotaxina provenientes de un individuo con IMC<3.00 Kg/cm<sup>2</sup>. Se presenta en cada histograma los niveles de a) paciente con 3 factores del SMet y HOMA>3.00 comparados con b) paciente con 2 factores del SMet y HOMA>3.00 y c) hombre con 2 factores del SMet y HOMA < 3.00. T=0 antes de iniciar el tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento. Los números encima de cada barra indican las veces de cambio con respecto al SHC, individuo con IMC< 30 Kg/cm<sup>2</sup>. La clave de cada individuo corresponde con la de la tabla del Anexo V.



Niveles de VEGF  
Obesidad Grado III

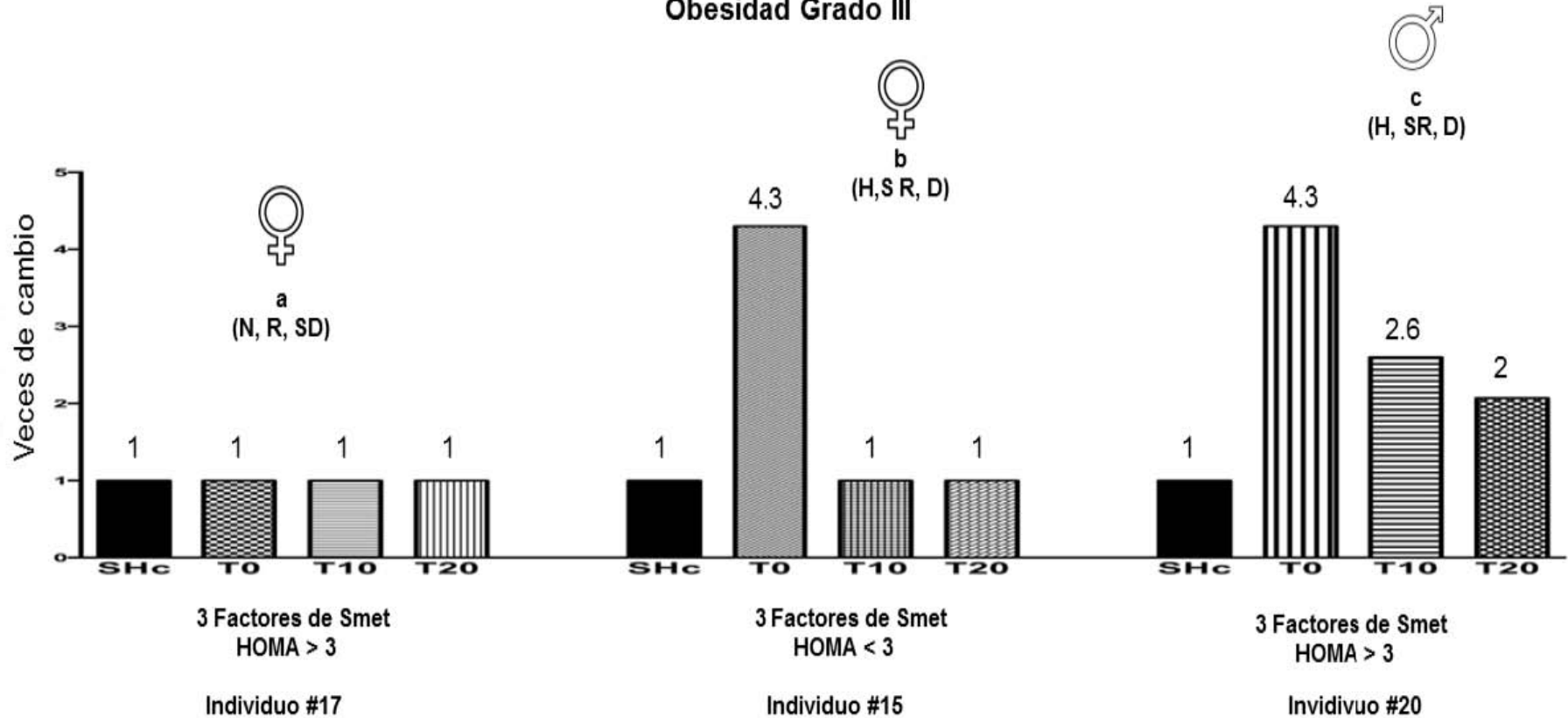


Figura 10 Los niveles de VEGF-A presentes en suero de mujeres y hombres con obesidad grado III con 3 o más factores del SMet y HOMA > 3.00 disminuyen después del tratamiento con Metformina. Detección de VEGF por medio de ELISA xMAP. Los valores se expresan en veces de cambio normalizados con los niveles de citocinas provenientes de un individuo IMC<3.00 Kg/cm<sup>2</sup>. Se presenta en cada histograma los niveles de a) paciente con 3 factores del SMet y HOMA >3.00 comparados con b) paciente con 2 factores del SMet y HOMA > 3.00 y c) hombre con 2 factores del SMet y HOMA < 3.00. T=0 antes de iniciar el tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento. Los números encima de cada barra indican las veces de cambio con respecto al SHC, individuo con IMC< 30 Kg/cm<sup>2</sup>. La clave de cada individuo corresponde con la de la tabla del Anexo V.

### **Ensayo de proliferación.**

El ensayo de proliferación fue realizado únicamente en pacientes del grupo I y III. Se excluyó del análisis al grupo II ya que la alta deserción debido a efectos secundarios gastrointestinales provocados por el tratamiento con metformina redujeron este subgrupo a solo cuatro hombres y una mujer con menos de tres factores del SMet y HOMA<3.00, por lo que no se pudo realizar comparaciones.

### **Obesidad grado I**

Se evaluó la proliferación de las células MCF-7 al suplementar el medio de cultivo RPMI-1640 con 5% del suero de cada mujer u hombre como se describe en materiales y métodos, comparando el efecto proliferativo de los sueros antes (T0) y después (T10 y T20) de tomar metformina. Como control de proliferación se empleó medio suplementado con insulina (5 U/ml), y como controladores de la adición de suero se emplearon pozos suplementados con 5% de suero bovino fetal o 5% de suero humano de un individuo con IMC<30. Para saber si había proliferación o muerte se valoró el número de células al inicio de cada ensayo (Basal).

Mujer con 3 o más factores de síndrome metabólico y HOMA > 3 (individuo #2). Al inicio del tratamiento con metformina (T0) el suero indujo una proliferación del 17.78% con respecto al suero del individuo con IMC<30 (SHc). A las 10 semanas (T10) la proliferación disminuyó 11% con respecto a T0 y a las 20 semanas (T20) disminuyó 41.5% con respecto a T0 (P=0.0036). A las 20 semanas se indujo muerte celular si se considera que el número celular fue menor a la basal (Figura 10 panel a). Al incorporar metformina 5mM al medio suplementado con el suero de los individuos participantes en el estudio se presentó muerte celular incluso con el suero de .10 semanas de tratamiento (T10). Es interesante notar que el suero de la paciente antes de iniciar el tratamiento (T0) mantuvo un porcentaje de proliferación semejante al adicionar metformina, mientras que el suero (SHc) suplementado con metformina presenta una tendencia a inducir muerte celular. Al inicio del tratamiento (T0) se observó una proliferación del 40% con respecto al suero SHc, y a las 10 y 20 semanas de

tratamiento (T10 y T20) la proliferación disminuyó 28.5% y 42.8% respectivamente. (Figura 10 panel b).

El suero de la mujer tratada con metformina por 10 y 20 semanas presentan una diferencia significativa ( $p=0.0036$ ) e inducen un efecto de muerte celular.

Para la mujer con 3 o más factores del SMet y HOMA $>3.00$  (Individuo #5) y las mujeres con 2 o menos factores del SMet y HOMA $>3.00$  (individuos #1, 3 y 4) los sueros de los 3 tiempos (T0, T10 y T20) no afectaron la proliferación que fue semejante a la que indujo el suero de la mujer con IMC $<30$  Kg/cm $^2$ .

Al incorporar metformina al medio suplementado con el suero de los individuos participantes en el estudio se indujo muerte celular, ya que fue 48% menor al valor basal. La muerte inducida fue semejante antes (T0) y después del tratamiento con metformina (T10 y T20) (Figura 11 panel b).

Para las mujeres # 1, 3 y 4. Se presentó una disminución en la proliferación del 15.76% sólo con el suero T20 con respecto a T0 (Figuras 11 y 2, panel a). Al incorporar metformina al medio suplementado con el suero humano se presentó muerte celular con el suero de T0. Cuando se añadió metformina a una concentración de 5 mM a los sueros T0, T10 y T20, no hubo diferencia entre los tiempos, aunque se presentó muerte celular (Figura 11 y 12 paneles b). Para el caso del suero de hombres con menos de 3 o más factores del SMet y HOMA $< 3.00$  (individuo #9) el efecto del suero T0, T10 y T20 disminuyó en la proliferación sin diferencia significativa (Figura 13, panel a). Cuando se agregó metformina *in vitro* a una concentración de 5mM se observó una inhibición en la proliferación al presentar un porcentaje de proliferación semejante al del control basal (T0, T10 y T20; 57% vs control basal;56%) y no indujo el mismo fenómeno de muerte celular observado en lo sueros de pacientes mujeres con el mismo perfil metabólico (Figura 13 panel b). Para hombres con 2 factores del SMet y HOMA  $< 3.00$  (6,7 y 8) el tratamiento a T0, T10 y T20 semanas con metformina indujo muerte celular en la línea celular MCF-7(Figura 14 panel a) y cuando se agregó metformina a una concentración 5mM a los sueros T0, T10 y T20 no se observó un efecto similar a los sueros sin metformina adicionada (Figura 14 panel b).

### **Obesidad Grado III**

Pacientes mujeres con 3 o más factores del SMet y HOMA > 3.00 (Paciente #14, 17 y 18). Se evaluó el efecto de los sueros T0, T10 y T20 en la proliferación de la línea celular MCF-7. El suero antes del tratamiento T0 presentó una proliferación del 28% en comparación con la basal, los sueros con 10 semanas de tratamiento T10 se observó una disminución en la proliferación del 43.8% con respecto a la observada en el T0 y reportó un 36% menos en comparación a la basal, presentando muerte celular. Para el tiempo T20 los sueros ejercieron un efecto mayor en la muerte celular reportando un 5% menos que T10, 48.1% menor que T0 y disminuyó un 50% con respecto a al basal (Figura 15 panel a). Al agregar metformina de manera *in vitro* a una concentración 5mM, el efecto de muerte celular fue más pronunciado reportando también una diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento (Figura 15 panel b).

Pacientes mujeres con 3 o más factores del SMet y HOMA < 3.00 (12 y 15), el efecto de los sueros antes de iniciar T0 reportó un porcentaje de proliferación del 30% y para T10 y T20 semanas de tratamiento no se observó un aumento significativo, manteniéndose en el mismo porcentaje del 30% para todos los tiempos (Figura 16 panel a). Se agregó metformina a una concentración de 5mM a los sueros T0, T10 y T20, se observó que el fármaco ejerce muerte celular en la línea celular MCF-7 sin presentar diferencia en aumento o disminución en la proliferación en los tres tiempos de tratamiento (Figura 16 panel b).

Los resultados mostraron que esta paciente con estas características metabólicas presenta una tendencia a proliferar más que el suero del individuo control y no se había presentado tal efecto. Cuando se agregó metformina, pero en los tres tiempos no hubo una diferencia significativa en cuanto una disminución menor al mezclar metformina con los sueros tratados por 10 y 20 semanas con metformina. en una concentración 5mM, metformina ejerce el efecto de muerte celular En cuanto a los hombres solo se obtuvieron 4 muestras con 3 o más factores del SMet y HOMA >3.00 (19, 20, 21y 22), hasta el momento no se cuenta con otro tipo de perfil metabólico. El suero de estos individuos antes del tratamiento T0, presentó una proliferación del 16.6% comparado con el control basal, a las 10 semanas de tratamiento T10 se reportó una disminución en la proliferación del 10% en comparación con T0 (T0;16.6 vs T10;6.6%) y para el T20

se observó una proliferación del 6.7% reportando solo un aumento del 0.1% en comparación con T10 (Figura 17 panel a y b). Los resultados observados en los hombres se mantuvieron constantes y no se presentó diferencia significativa (Figura 17).

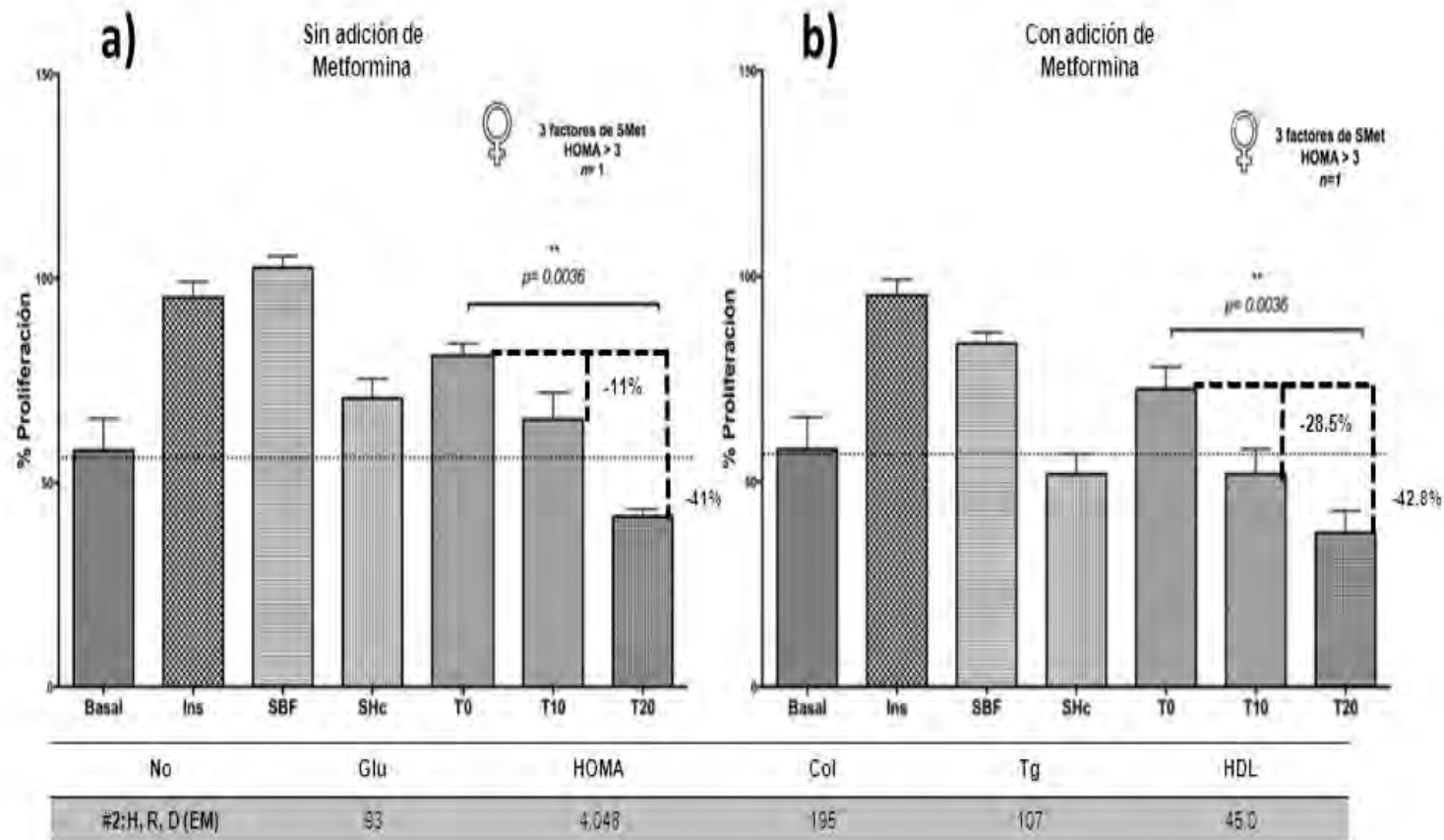


Figura 10. El efecto del suero de pacientes mujeres del grupo de obesidad grado I tratadas con metformina con 3 factores del SMet y HOMA > 3.00 produce muerte celular en la línea celular MCF-7. a) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujer durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol. b) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujer durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol y se suplementado con metformina a una concentración de 5mM. T0= antes del tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento. Basal = densidad celular al inicio del ensayo, Ins = Insulina, SBF= Suero bovino fetal y SHc= suero individuo con IMC < 30. Glu: Glucosa(85-110 mg/dl); Col: Colesterol total (<200 mg/dL); Tg: Triglicéridos (10-150 mg/dL); HDL (40-60 mg/dL); SD: Sin dislipidemia D: Dislipidemia; R: Resistencia a carbohidratos; SR: Sin resistencia a carbohidratos; H: Hipertensión  $\geq 140/90$  mmHg; EM: ELISA Multiplex realizado \*: valores anormales

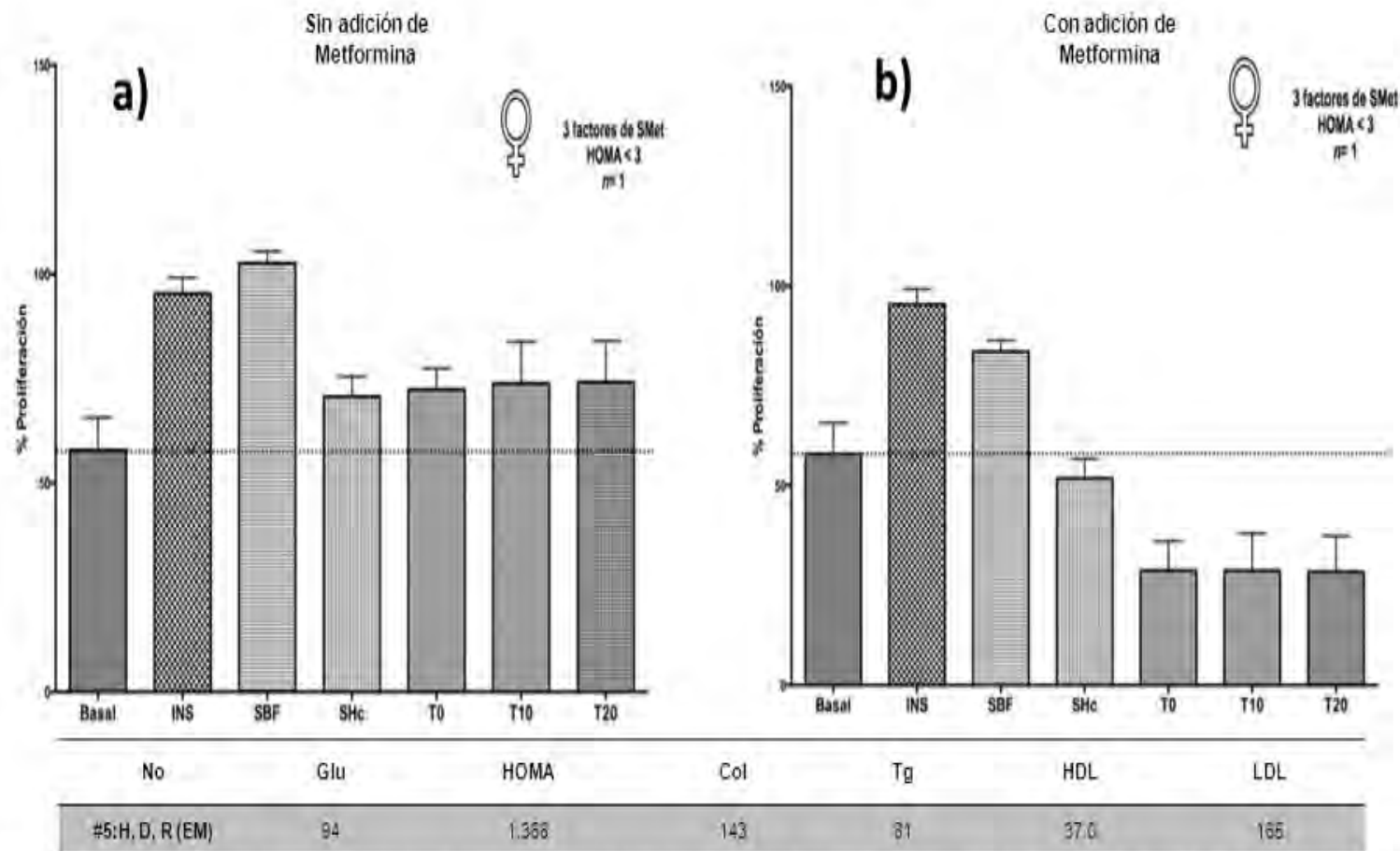


Figura 11. El efecto del suero de pacientes mujeres del grupo de obesidad grado I tratadas con metformina con 2 factores del Smet y HOMA > 3.00 no induce cambios en la proliferación de MCF-7. a) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujer durante 48 h, a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol. b) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujer durante 48 h, a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol y se suplementado con metformina a una concentración de 5mM. T0= antes del tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento, Basal = densidad celular al inicio del ensayo, Ins = Insulina, SBF= Suero bovino fetal y SHc= suero individuo con IMC < 30. Glu: Glucosa(85-110 mg/dl); Col: Colesterol total (<200 mg/dL); Tg: Triglicéridos (10-150 mg/dL); HDL (40-60 mg/dL); SD: Sin dislipidemia D: Dislipidemia; R: Resistencia a carbohidratos; SR: Sin resistencia a carbohidratos; H: Hipertensión  $\geq 140/90$  mmHg; EM: ELISA Multiplex realizado\*; valores anormales

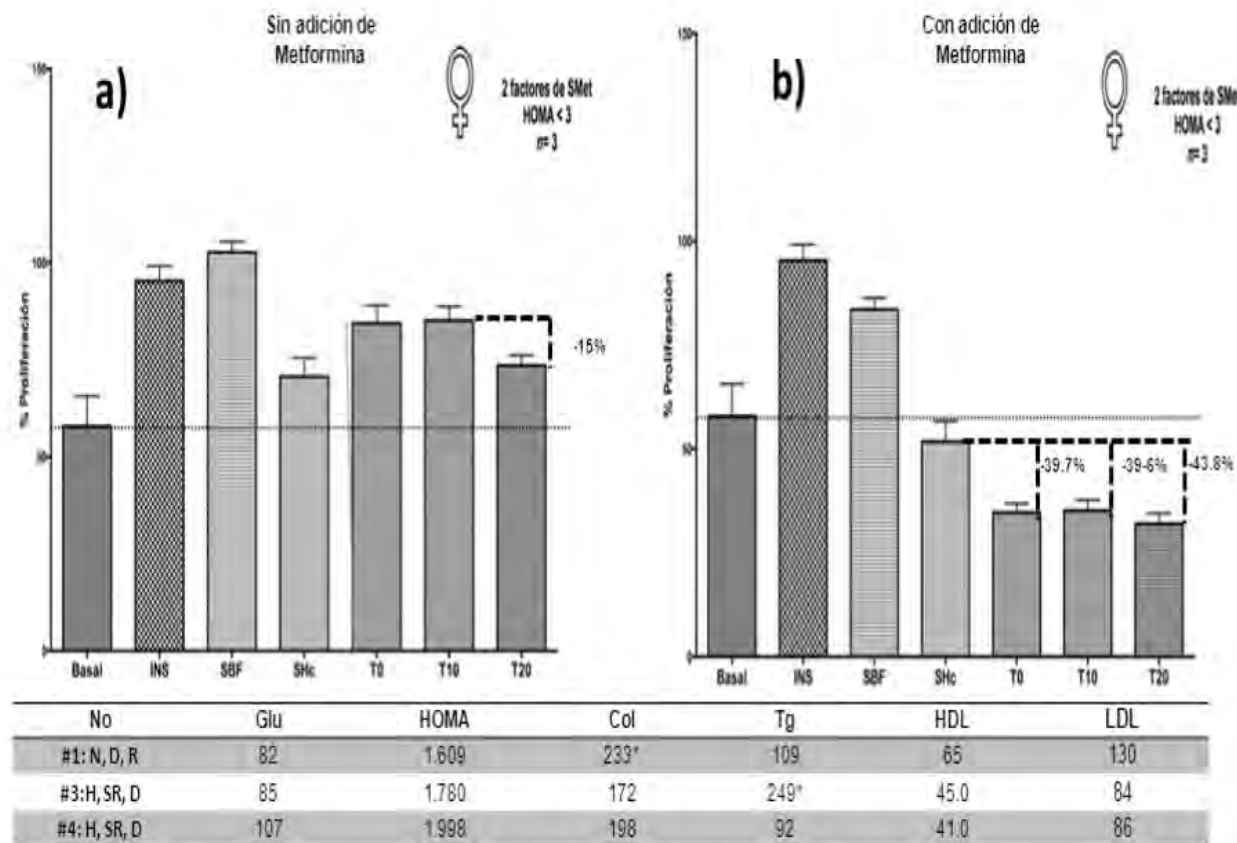


Figura 12. El efecto del suero de pacientes mujeres del grupo de obesidad grado I tratadas con metformina con 2 factores del SMet y HOMA < 3.00 no induce cambios en la proliferación de MCF-7. a) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujeres durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol. b) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujeres durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol y se suplementado con metformina a una concentración de 5mM. T0= antes del tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20=20 semanas de tratamiento, Basal = densidad celular al inicio del ensayo, Ins = insulina, SBF= Suero bovino fetal y SHc= suero individuo con IMC < 30. Glu: Glucosa(85-110 mg/dl); Col: Colesterol total (<200 mg/dL); Tg: Triglicéridos (10-150 mg/dL); HDL (40-60 mg/dL); SD: Sin dislipidemia D: Dislipidemia; R: Resistencia a carbohidratos; SR: Sin resistencia a carbohidratos; H: Hipertensión ≥140/90 mmHg; EM: ELISA Multiolex realizado \*: valores anormales



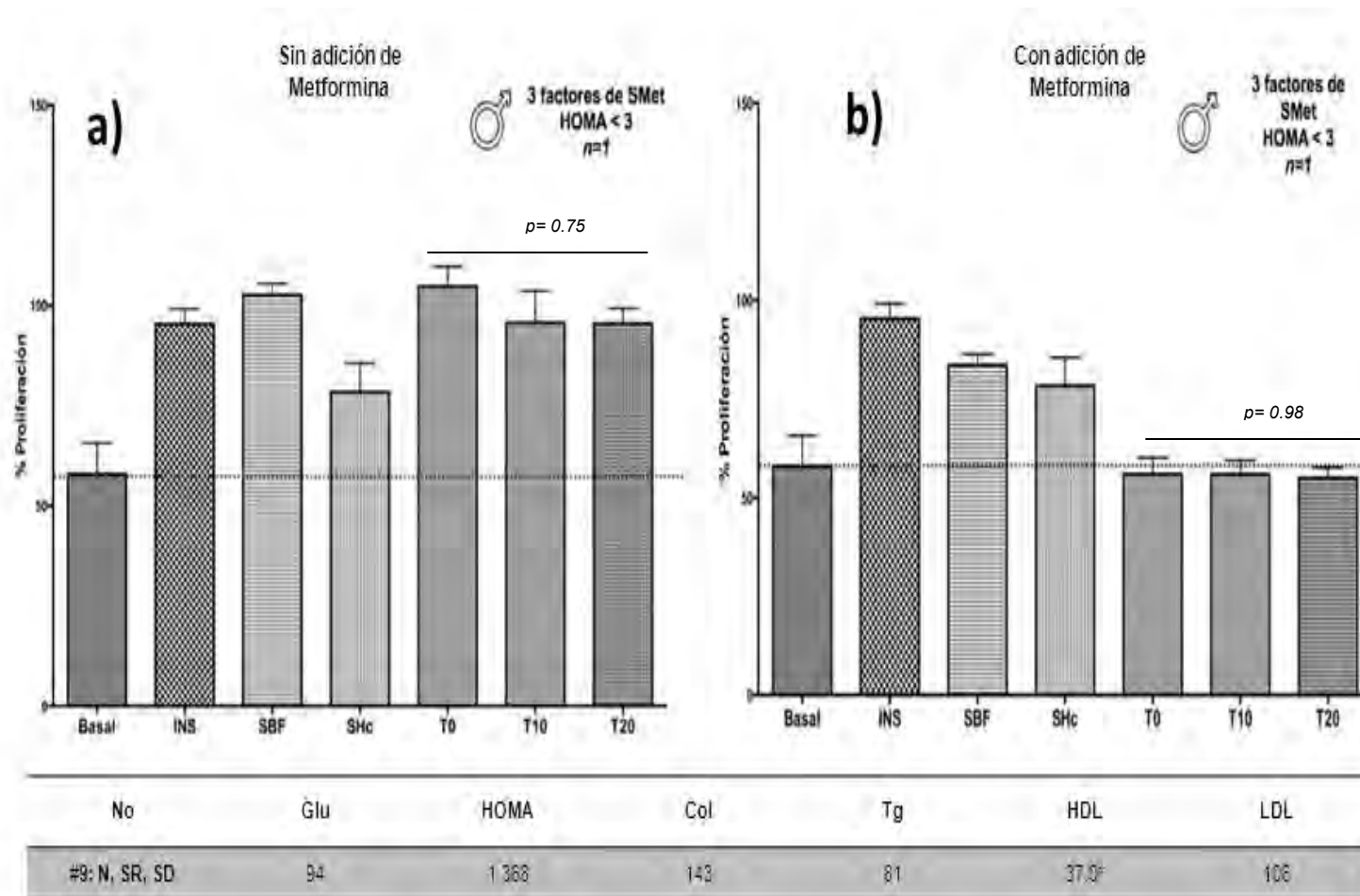
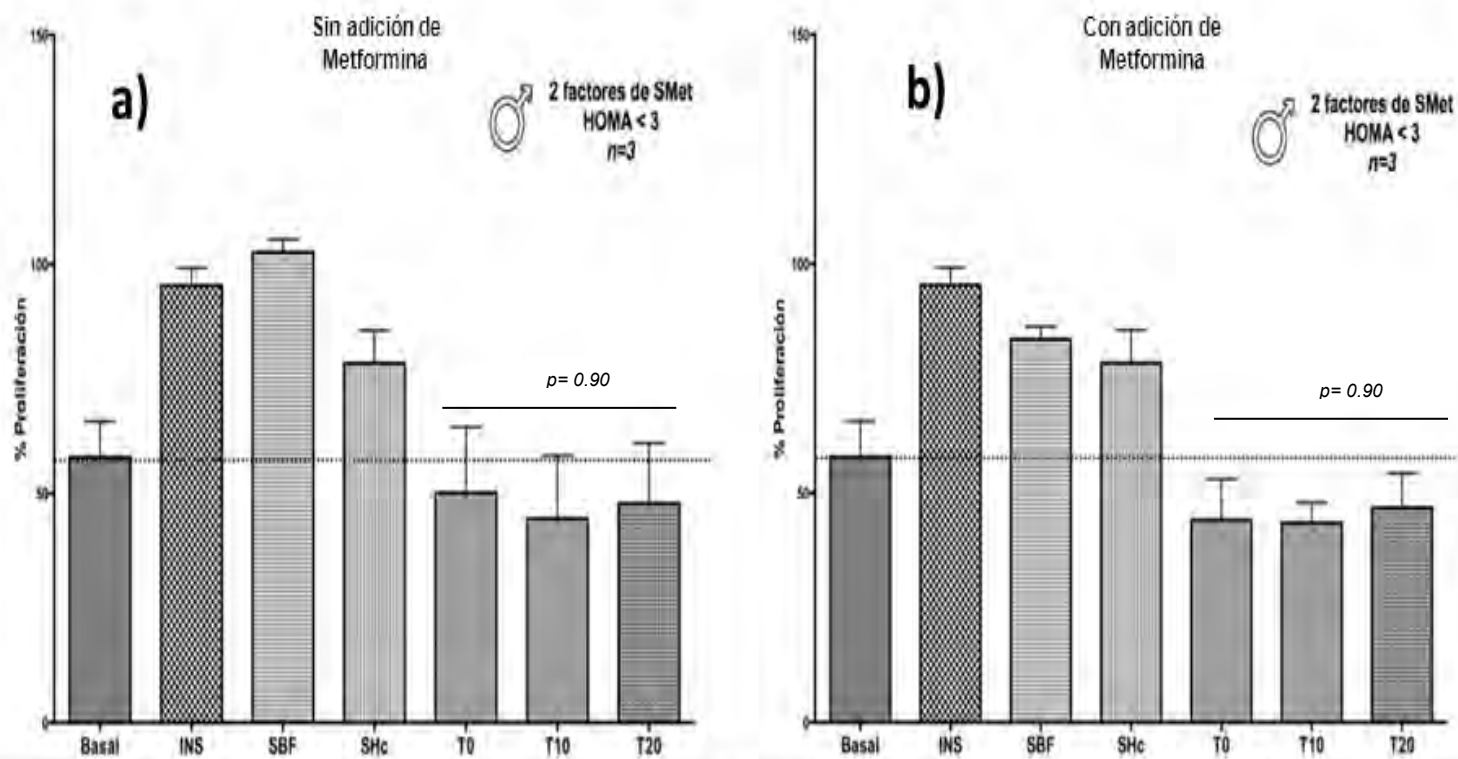


Figura 13. El efecto del suero de controles hombres del grupo de obesidad grado I tratados con metformina con 3 factores del SMet y HOMA < 3.00 no induce cambios en la proliferación de MCF-7. a) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de hombre durante 48 h, a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol. b) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de hombre durante 48 h, a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol y se suplementado con metformina a una concentración de 5mM. T0= antes del tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento. Basal = densidad celular al inicio del ensayo. Ins = Insulina, SBF= Suero bovino fetal y SHc= suero humano control. Glu: Glucosa(85-110 mg/dl); Col: Colesterol total (<200 mg/dL); Tg: Triglicéridos (10-150 mg/dL); HDL (40-60 mg/dL); D: Dislipidemia; R: Resistencia carbohidratos; H: Hipertensión; \*: valores anormales



	No	Glu	HOMA	Col	Tg	HDL	LDL
#6: N, SR, D	82	1.608	233*	109	66	87	
#7: N, SR, D (EM)	85	1.987	198	92	41	119	
#8: N SR, D	107	1.998	207*	217*	446	139	

Figura 14. El efecto del suero de controles hombres del grupo de obesidad grado I tratados con metformina con 3 factores del SMet y HOMA < 3.00 no induce cambios en la proliferación de MCF-7. a) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de hombres durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol. b) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de hombres durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol y se suplementado con metformina a una concentración de 5mM T0= antes del tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento. **Basal** = densidad celular al inicio del ensayo, **Ins** = Insulina, **SBF**= Suero bovino fetal y **SHc**= suero individuo con IMC < 30. **Glu**: Glucosa(85-110 mg/dl); **Col**: Colesterol total (<200 mg/dL); **Tg**: Triglicéridos (10-150 mg/dL); **HDL** (40-60 mg/dL); **SD**: Sin dislipidemia D: Dislipidemia; **R**: Resistencia a carbohidratos; **SR**: Sin resistencia a carbohidratos; **H**: Hipertensión ≥140/90 mmHg; **EM**: ELISA Multiplex realizado \*: valores anormales

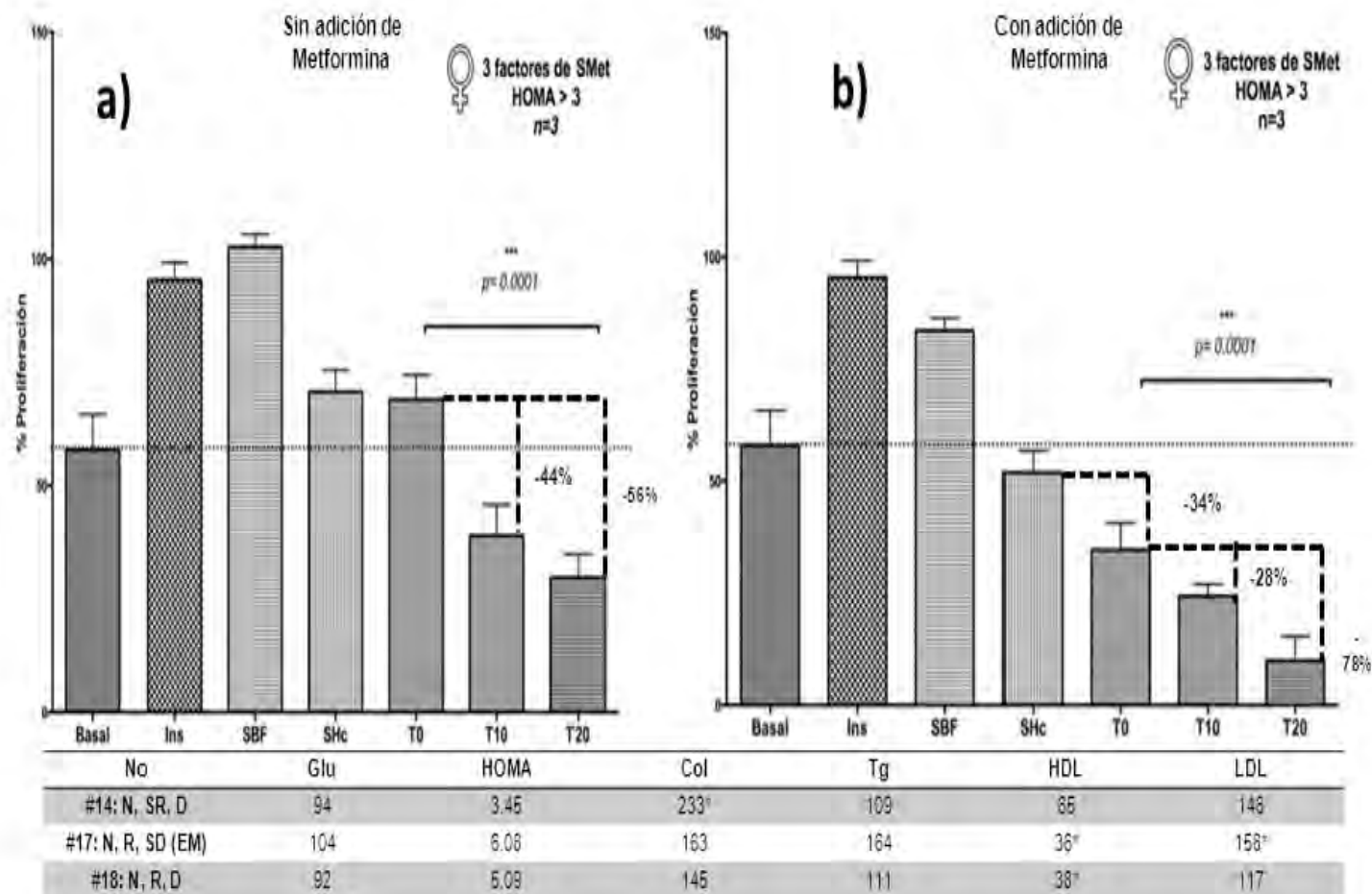


Figura 15. El efecto del suero de pacientes mujeres del grupo de obesidad grado III tratadas con metformina con 3 factores del SMet y HOMA > 3.00 induce muerte celular en la línea celular MCF-7. a) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujeres durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol. b) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujeres durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol y se suplementado con metformina a una concentración de 5mM. T0= antes del tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento, Basal = densidad celular al inicio del ensayo, Ins = Insulina, SBF= Suero bovino fetal y SHc= suero individuo con IMC < 30. Glu: Glucosa(85-110 mg/dl); Col: Colesterol total (<200 mg/dL); Tg: Triglicéridos (10-150 mg/dL); HDL (40-60 mg/dL); SD: Sin dislipidemia D: Dislipidemia; R: Resistencia a carbohidratos; SR: Sin resistencia a carbohidratos; H: Hipertensión ≥ 140/90 mmHg; EM: ELISA Multiplex realizado\*; valores anormales

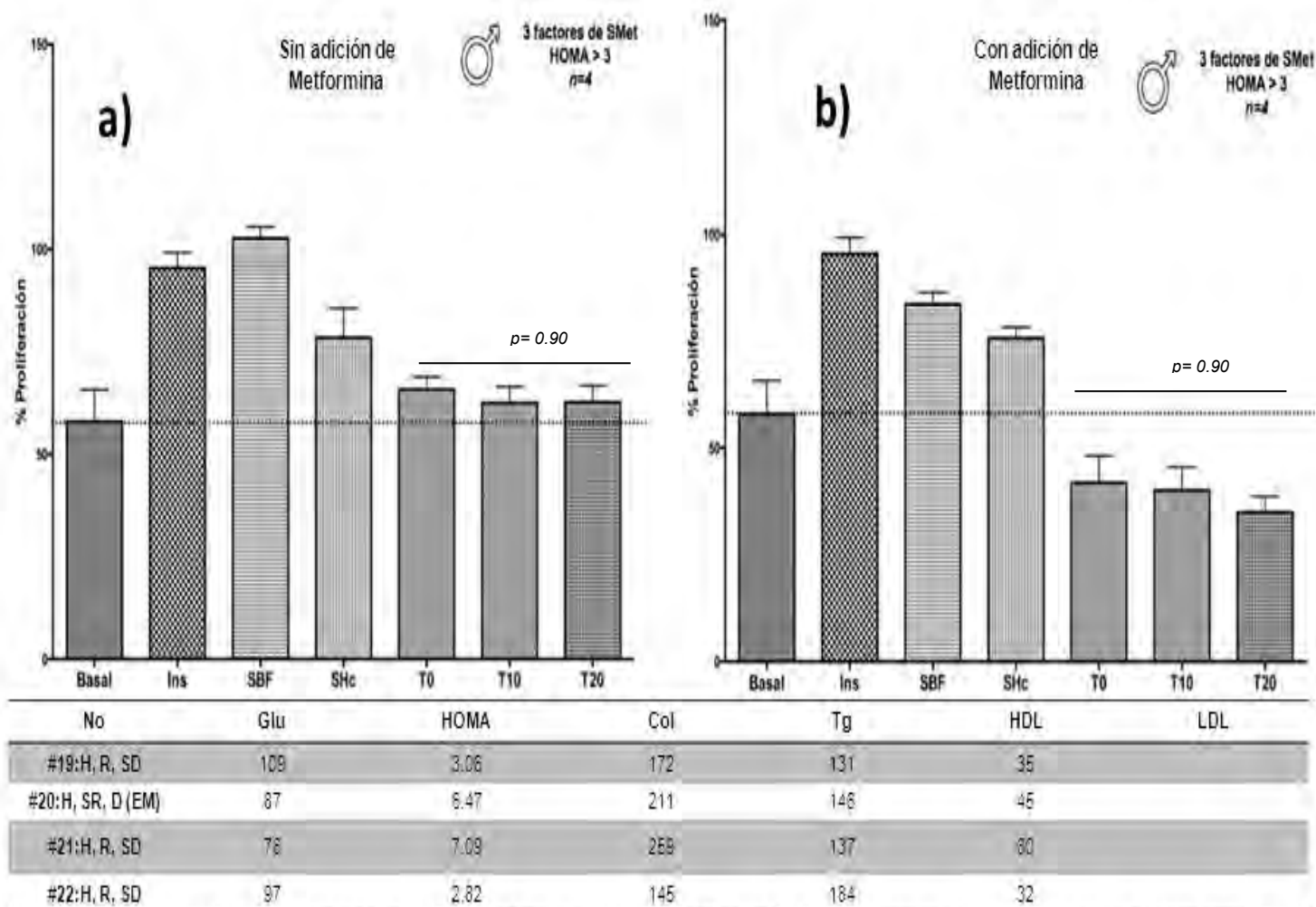


Figura 18. El suero de mujeres del grupo de obesidad grado III con 3 factores del SMet y HOMA < 3.00 tratadas con metformina no induce cambios en la proliferación de la línea celular MCF-7. a) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de hombres durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol. b) Ensayo de proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de hombre durante 48 h. a una concentración del 5% (volumen/volumen) con medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo de fenol y se suplementado con metformina a una concentración de 5mM. T0= antes del tratamiento, T10=10 semanas de tratamiento y T20= 20 semanas de tratamiento, Basal = densidad celular al inicio del ensayo, Ins = Insulina, SBF= Suero bovino fetal y SHc= suero individuo con IMC<30. Glu; Glucosa(85-110 mg/dl); Col: Colesterol total (<200 mg/dL); Tg; Triglicéridos (10-150 mg/dL); HDL (40-60 mg/dL); SD: Sin dislipidemia D: Dislipidemia; R: Resistencia a carbohidratos; SR: Sin resistencia a carbohidratos; H: Hipertensión ≥140/90 mmHg; EM: ELISA Multiplex realizado; \*; valores anormales

## VIII. Discusión

En los últimos años se ha documentado que existe una clara correlación entre obesidad y cáncer, llegándose a reconocer a la obesidad como un elemento de riesgo para el desarrollo de cáncer en general y en particular para el CaM [51].

Se ha postulado que la conexión entre la obesidad y el desarrollo de cáncer es la secreción de moléculas de la respuesta inmune [67]. Aunque no está claro el mecanismo biológico específico de estas moléculas con el desarrollo del cáncer, se sugiere que es iniciada por un estado de hipoxia debido a la ganancia de tejido adiposo, que comprende una relación en crecimiento y proliferación de adipocitos y la activación del factor inducible de hipoxia (HIF-1, por sus siglas en inglés) [74]. La activación de HIF-1 está asociada con un aumento en la concentración de citocinas y quimiocinas séricas. La ganancia de adiposidad genera el aumento de moléculas pro inflamatorias como TNF-alfa e IL-6, interesantemente, estas moléculas están involucradas en el desarrollo de resistencia a la insulina [111], [112], con base en estos antecedentes nosotros analizamos un panel de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por medio de un inmunoensayo múltiplex en el suero de pacientes antes y después de 10 y 20 semanas de tratamiento con metformina de un grupo de mujeres con IMC > 30 Kg/m<sup>2</sup>.

### **Efecto de metformina sobre la concentración de citocinas y factores de crecimiento en pacientes con obesidad de grado I**

#### **Interleucinas**

Los resultados sugieren que para mujeres con obesidad grado I IMC 30-35 Kg/cm<sup>2</sup> con 2 o más factores del SMet y HOMA > 3.00, el tratamiento con metformina disminuye los niveles de IL-1 $\beta$  hasta 6 veces después de 20 semanas de tratamiento y de IL-2 4.5 veces en contraste con los hombres. Cabe señalar que la disminución se presenta desde las 10 semanas de tratamiento. Se conoce que la IL-1 $\beta$  tiene actividad de señalización en hígado y tejido adiposo. En tejido adiposo señala para la activación de moléculas relacionadas con el inflamosoma y así puede contribuir a la secreción de interleucinas asociadas con la obesidad [40], [113], [114]. Por otra parte, la IL-2, estimula el crecimiento de linfocitos T y regula

la respuesta inflamatoria y es secretada en grandes cantidades cuando la concentración de leptina es elevada en pacientes con obesidad, desencadenando una respuesta inmune no regulada [115]. Metformina podría disminuir los niveles de IL-2 por un efecto indirecto en la disminución de la leptina y un aumento en la adiponectina.

Sin embargo, aún no se ha esclarecido el mecanismo por el cual la metformina ejerce sus efectos sistémicos en obesidad y cáncer.

De los diferentes factores de crecimiento analizados en este estudio solo los niveles séricos de VEGF variaron. En pacientes con obesidad grado III con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 la metformina aumentó los niveles de VEGF 3 veces hasta las 20 semanas de tratamiento, en contraste con aquellas mujeres con 2 o menos factores del SMet. En el suero de hombres con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 hubo una caída en los niveles de VEGF hasta de 3 veces. Recientemente, se ha sugerido que la metformina tiene efectos anti-angiogénicos. Sin embargo, hay controversia sobre la acción de la metformina sobre VEGF. Se ha reportado que la metformina puede disminuir los niveles de VEGF en modelos de enfermedades cardiovasculares in vivo, así como también disminuirlos en modelos de estudios de cáncer por acción indirecta a través de AMPK [116], [117].

### **Efecto de metformina sobre la concentración de citocinas y factores de crecimiento en pacientes con obesidad de grado III**

En el caso de las mujeres con obesidad grado III con cualquier factor del SMet y HOMA<3.00, los niveles de TNF-alfa fueron afectados después del tratamiento con metformina disminuyendo 1.5 veces en comparación con los niveles antes de iniciar el tratamiento. El TNF-alfa es una molécula potente que ejerce un efecto pro inflamatorio en el organismo. Específicamente, el TNF-alfa en la obesidad, está ligado al desarrollo de la resistencia a insulina y que ésta citocina es sobre expresada por el tejido adiposo [118]. Nuestros resultados contrastan con aquellos que se han realizado en pacientes con enfermedades cardiovasculares y con estudios in vitro con metformina sobre células tumorales y linfocíticas en las que induce una sobre expresión y aumento en los niveles de TNF-alfa en pacientes sin obesidad [119]. Nuestra cohorte fue de mujeres con obesidad y el efecto de

disminución de TNF-alfa parece estar asociado a la presencia de niveles altos de insulina. La quimiocina Eotaxina (CCL11), es una quimio atrayente de eosinófilos séricos que específicamente promueve su migración a los pulmones y está relacionada fuertemente con el desarrollo de asma. Recientemente, ésta quimiocina se encontró aumentada en individuos con obesidad. Sin embargo, su mecanismo de acción en la obesidad aún permanece incierto. Lo que hallamos en nuestros resultados es una disminución de 0.5 veces en los niveles de ésta quimiocina en mujeres con 3 o más factores del SMet y HOMA < 3.00, en contraste con mujeres de las mismas características del SMet, pero con HOMA > 3.00. Por otra parte, los hombres presentaron una disminución en 3.41 veces. Nuestros resultados coinciden con un estudio que prueba metformina en ratones con obesidad en un modelo de asma [130]. La metformina disminuye los niveles de Eotaxina en ratones obesos hasta llegar a niveles semejantes a los de ratones sin obesidad [129]. Sin embargo, al no tener un estudio en humanos no es posible comparar nuestros resultados.

Para VEGF en mujeres con obesidad grado III, hubo diferencia en los niveles de VEGF en pacientes con 3 o más factores del SMet y HOMA < 3.00 disminuyendo 3 veces los niveles después del tratamiento con metformina. Sin embargo, el mismo efecto es visualizado en hombres con obesidad grado III. Estos resultados contrastan en mujeres con obesidad grado I en donde VEGF aumenta a la semana 20 de tratamiento. Estos resultados sugieren que el grado de obesidad interviene en el efecto de la metformina sobre esta molécula.

Este es el primer estudio que involucra la medición en suero de este tipo de moléculas en pacientes con obesidad y tratamiento farmacológico con metformina. La mayoría de estudios con metformina se han realizado en cultivo celular y han probado la actividad directa de metformina sobre la expresión de moléculas inflamatorias, mientras que en nuestro estudio se valora el efecto sistémico de la metformina.

## **El suero de pacientes mujeres con obesidad grado I y III inducen muerte celular después del tratamiento con metformina en la línea celular MCF-7 y es dependiente del perfil metabólico**

Este trabajo, demostró la capacidad de utilizar una línea celular como biosensor de cambios séricos de mujeres y hombres tratados con metformina durante 10 y 20 semanas. Las células MCF7 que provienen de CaM humano mostraron ser capaces de detectar y distinguir cambios en los sueros de mujeres y hombres a través de su proliferación y viabilidad en cultivo. Nuestros resultados sugieren que mujeres que tienen un perfil metabólico definido, en este caso, con 3 o más factores del SMet y HOMA>3.00 la administración durante 10 y 20 semanas induce cambios en la composición que afectan proliferación e inclusive induce muerte en la línea celular MCF-7. En contraste, los sueros de las mujeres que no poseen este perfil metabólico no tienen estos efectos antes o después del tratamiento con metformina. Al agregar metformina *in vitro* a una concentración de 5mM, que es la máxima tolerada por los pacientes en este protocolo, se exacerba el efecto inductor de muerte de los sueros de mujeres con el perfil metabólico de más de 3 factores de SMet y HOMA>3.00. Además, sigue siendo diferencial, esto es, que a la semana 20 de tratamiento con metformina, más metformina agregada *in vitro*, el efecto se potencia causando aún más muerte que el suero de 10 semanas de tratamiento. Nuestros resultados se relacionan con los diversos estudios epidemiológicos y de laboratorios que han sugerido que la metformina tiene actividad anti tumoral en pacientes diabéticos, debido a que estos pacientes presentan concentraciones altas de insulina. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el efecto puede ser indirecto y global que puede reflejarse a nivel sérico de los pacientes [120]–[122].

Nuestro diseño de estudio optó por usar el suero de los pacientes sin la inactivación del sistema de complemento. La primera impresión del efecto de muerte celular inducida por los sueros después de 10 y 20 semanas de tratamiento, podría ser por la activación del complemento. Sin embargo, en la estandarización del ensayo de proliferación, el suero inactivado y el no inactivado no presentaron diferencia en el nivel de proliferación y no indujeron muerte en la



línea celular MCF-7 (ANEXO III). El efecto observado puede deberse a cambios en la composición sérica inducidos por el tratamiento con metformina que hace que las células MCF-7 sean más sensibles al complemento y/o los componentes en las muestras de suero activen al complemento. El sistema del complemento ha evolucionado como una primera defensa contra las células y elementos ajenos al hospedero. El complemento actúa en un amplio rango desde lisis celular directa a el control de la inmunidad innata y adaptativa [123]. No existe evidencia aún de que el complemento pueda eliminar células tumorales nacientes en el organismo. Sin embargo, ensayos clínicos indican que existe activación del complemento en pacientes con cáncer [124]. Por otra parte se ha reportado que las células tumorales pueden modular la cascada de complemento sobre expresando proteínas membranales reguladoras del complemento como: CD47 y CD 55 [125], [126]. Con esta información podemos postular que la línea celular que usamos tiene sus propios mecanismos para defenderse del complemento, en contraste con otras líneas utilizadas (datos no mostrados) que fueron sensibles al complemento. Se ha demostrado que la concentración de complemento en suero de pacientes con obesidad son más altos que aquellos que posee IMC normal [127]. En particular, la ganancia de tejido adiposo en mujeres está asociado a un incremento en la proteína C3 del sistema del complemento [128]. Nuestros resultados muestran que las mujeres con obesidad grado I y II con HOMA>3.00 y 3 factores del SMet inducen muerte de las células MCF7 en respuesta al tratamiento con metformina. Evidencia reciente, sugiere que en pacientes con resistencia a la insulina y SMet existen concentraciones elevadas de varios componentes del sistema de complemento como: C1q, C1r y C1s [129], [130]. Metformina induce el incremento de proteínas de complemento por ejemplo, un estudio revela que cuando se trata a mujeres con SMet y resistencia a la insulina con metformina, incrementa una novedosa adipocinas denominada cartonectina (súper familia 3 relacionada con TNF-C1q, CRP3), interesantemente, no disminuye la concentración de C3 [131], [132]. Nuestros resultados podrían explicarse por estos mecanismos. Primero, las mujeres con 3 factores del SMet y HOMA>3.00 podrían tener una alta concentración C3, pero baja de C1q, por lo

que el complemento no activaría de manera deficiente dándole la oportunidad a la línea celular MCF-7 de evadir esta respuesta. Este escenario explicaría la ausencia de muerte antes del tratamiento con metformina (T0). Segundo, cuando reciben tratamiento con metformina las 10 y 20 semanas, se esperaría que la concentración de adipocinas se incrementara reestableciendo la cascada del complemento. Sin embargo, el efecto que vemos puede ser resultado de otra forma de muerte celular como la apoptosis por elementos desconocidos inducidos por el tratamiento con metformina.

Nuestro estudio tiene limitaciones. Por una parte, se debe contar con una cohorte con mayor número de mujeres y hombres con las mismas características metabólicas, en particular los componentes del SMet, hormonas y HOMA. Esto permitirá ratificar el efecto visto en este estudio preliminar. Se deben medir parámetros clínicos como concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol asociado a HDL, colesterol asociado a LDL, glucosa e insulina después de 10 y 20 semanas de tratamiento para relacionar el efecto de metformina global. Algo sustancial que queda pendiente es la determinación de metformina que se encuentra en suero después del tratamiento, para descartar que el efecto no sea por metformina circulante y ratificar el apego a la dosis de cada individuo para poder concluir si es un efecto indirecto, directo o ambos.

HOMA es una variable que relaciona la concentración de glucosa e insulina en ayuno y es el modelo de evaluación a la resistencia a la insulina. En este estudio, la presencia de un  $HOMA > 3.00$  parece ser un elemento crítico para inducir el efecto de muerte en la línea celular. Sin embargo, el valor de HOMA en los pacientes no es representativo, ya que el HOMA fue tomado en momentos diferentes y no fue tomado sistemáticamente al inicio del protocolo. Se conoce que el HOMA es variable sensible e inestable y se ve influenciado por los hábitos alimenticios y el estilo de vida. También es importante considerar que intervenciones farmacológicas distintas a metformina no fueron controlados en este estudio.

El presente trabajo será la base para estudios más a fondo sobre cambios en la composición sérica de las mujeres obesas que reciben metformina, así como también, estudios moleculares de muerte en las líneas celulares.

Este estudio demostró que la metformina tiene un efecto en la concentración de citocinas, en las quimiocinas y factores de crecimiento. El uso de una línea celular que pueda detectar estos cambios séricos por el tratamiento de este fármaco nos podría llevar a poder identificar componentes séricos que servirían como firmas moleculares de la respuesta a metformina.

Nuestros resultados confirman que las líneas celulares como MCF7 pueden servir como biosensor de cambios en la composición sérica de mujeres obesas que reciben metformina y que estos cambios se asocian a condiciones metabólicas definidas del SMet y del HOMA.

## **IX. Conclusión**

En el suero de pacientes con 3 o más factores indistintos del SMet y HOMA<3.00 existen cambios en la composición de factores solubles como IL-1 $\beta$ , IL-2, VEGF y Eotaxina inducidos por el tratamiento de metformina. La línea celular MCF-7 pudo sensor sueros de pacientes con 3 o más factores indistintos del SMet y HOMA < 3.00 que inducen muerte y diferenciar de aquellos que no la inducen.

## X. Referencias

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram I, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman D, and F. Bray, "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.," *Int. J. Cancer*, Sep. 2014.
- [2] A. Jemal, M. M. Center, C. DeSantis, and E. M. Ward, "Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 19, no. 8, pp. 1893–1907, 2010.
- [3] L. N. et al Mackay J, Jemal A, *The Cancer Atlas*. Atlanta: The American Cancer Society, 2006.
- [4] W. F. Anderson, P. S. Rosenberg, A. Prat, C. M. Perou, and M. E. Sherman, "How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 106, no. 8, pp. 1–11, 2014.
- [5] K. a Cadoo, T. a Traina, and T. a King, "Advances in molecular and clinical subtyping of breast cancer and their implications for therapy.," *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, vol. 22, no. 4, pp. 823–40, Oct. 2013.
- [6] P. Eroles, A. Bosch, J. A. Pérez-Fidalgo, and A. Lluch, "Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways.," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 38, no. 6, pp. 698–707, Oct. 2012.
- [7] A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, D. G. Hicks, M. Dowsett, L. M. McShane, K. H. Allison, D. C. Allred, J. M. S. Bartlett, M. Bilous, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R. B. Jenkins, P. B. Mangu, S. Paik, E. a Perez, M. F. Press, P. a Spears, G. H. Vance, G. Viale, and D. F. Hayes, "Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 31, pp. 3997–4013, 2013.
- [8] K. N. Anderson, R. B. Schwab, and M. E. Martinez, "Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature.," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 144, no. 1, pp. 1–10, Feb. 2014.
- [9] E. Tokunaga, Y. Hisamatsu, K. Tanaka, N. Yamashita, H. Saeki, E. Oki, H. Kitao, and Y. Maehara, "Molecular mechanisms regulating the hormone sensitivity of breast cancer," *Cancer Sci.*, vol. 105, no. 11, pp. 1377–1383, 2014.
- [10] I. H. Russo and J. Russo, "Pregnancy-induced changes in breast cancer risk," *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 16, no. 3, pp. 221–233, 2011.
- [11] P. Schedin, "Pregnancy-associated breast cancer and metastasis.," *Nat.*

*Rev. Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 281–291, 2006.

- [12] P. H. Gann and M. Morrow, “Combined hormone therapy and breast cancer: a single-edged sword.,” *JAMA: the journal of the American Medical Association*, vol. 289, no. 24. pp. 3304–3306, 2003.
- [13] P. B. Bach, “Postmenopausal hormone therapy and breast cancer: an uncertain trade-off.,” *JAMA: the journal of the American Medical Association*, vol. 304, no. 15. pp. 1719–1720, 2010.
- [14] F. Cardoso and E. Senkus, “Breast cancer in 2014: A call back to reality!,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 12, no. 2, pp. 67–68, 2015.
- [15] S. a. Narod, “Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 8, no. 11, pp. 669–676, 2011.
- [16] J.-Z. Cerne, S. Frkovic-Grazio, and K. Gersak, “Breast Tumor Characteristics in Hormone Replacement Therapy Users,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 917–923, 2011.
- [17] C. M. Ronckers, C. a Erdmann, and C. E. Land, “Radiation and breast cancer: a review of current evidence.,” *Breast Cancer Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 21–32, 2005.
- [18] J. Luo, K. L. Margolis, J. Wactawski-Wende, K. Horn, C. Messina, M. L. Stefanick, H. a Tindle, E. Tong, and T. E. Rohan, “Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study.,” *BMJ*, vol. 342, p. d1016, 2011.
- [19] W. Y. Chen, “Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk,” *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. 306, no. 17. p. 1884, 2011.
- [20] R. Roy, J. Chun, and S. N. Powell, “BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 1, pp. 68–78, 2011.
- [21] a R. Venkitaraman, “Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage.,” *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 20, pp. 3591–3598, 2001.
- [22] S. A. Narod, “BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art.,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 12, pp. 702–707, 2010.
- [23] K. B. Michels, K. L. Terry, and W. C. Willett, “Longitudinal study on the role of body size in premenopausal breast cancer.,” *Arch. Intern. Med.*, vol. 166, no. 21, pp. 2395–2402, 2006.
- [24] E. Cavalieri and E. Rogan, “The molecular etiology and prevention of estrogen-initiated cancers: Ockham’s Razor: Pluralitas non est ponenda sine necessitate. Plurality should not be posited without necessity,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 36, no. 1, pp. 1–55, 2014.
- [25] G. Kabat, E. O’Leary, and M. Gammon, “Estrogen metabolism and breast

- cancer,” ..., no. September, pp. 6–11, 2006.
- [26] M. Chang, “Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis,” *BMB Rep.*, vol. 44, no. 7, pp. 423–434, 2011.
- [27] D. Germain, “Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer,” *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 40, no. 3, pp. 473–484, 2011.
- [28] W. Yue, J. D. Yager, J. P. Wang, E. R. Jupe, and R. J. Santen, “Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis,” *Steroids*, vol. 78, no. 2, pp. 161–170, 2013.
- [29] J. D. Yager and J. G. Liehr, “Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 36, pp. 203–232, 1996.
- [30] W. Yue, R. J. Santen, J. P. Wang, Y. Li, M. F. Verderame, W. P. Bocchinfuso, K. S. Korach, P. Devanesan, R. Todorovic, E. G. Rogan, and E. L. Cavalieri, “Genotoxic metabolites of estradiol in breast: Potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis,” in *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, vol. 86, no. 3–5, pp. 477–486.
- [31] E. Cavalieri, D. Chakravarti, J. Guttenplan, E. Hart, J. Ingle, R. Jankowiak, P. Muti, E. Rogan, J. Russo, R. Santen, and T. Sutter, “Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1766, no. 1, pp. 63–78, 2006.
- [32] N. Ouchi, J. L. Parker, J. J. Lugus, and K. Walsh, “Adipokines in inflammation and metabolic disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 2, pp. 85–97, 2011.
- [33] J. N. Fain, A. K. Madan, M. L. Hiler, P. Cheema, and S. W. Bahouth, “Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans,” *Endocrinology*, vol. 145, no. 5, pp. 2273–2282, 2004.
- [34] S. D. Hursting, “Obesity , Energy Balance , and Cancer : A Mechanistic Perspective Á Growth factor signaling Á Vascular perturbations Á,” pp. 21–34.
- [35] S. Brauna, K. Bitton-Worms, and D. le Roith, “The link between the metabolic syndrome and cancer,” *International Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 7, pp. 1003–1015, 2011.
- [36] K. Aleksandrova, K. Nimptsch, and T. Pischon, “Influence of Obesity and Related Metabolic Alterations on Colorectal Cancer Risk,” *Curr. Nutr. Rep.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–9, 2013.
- [37] E. R. Simpson and K. a Brown, “Minireview: Obesity and breast cancer: a tale of inflammation and dysregulated metabolism,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 27, no. 5, pp. 715–25, 2013.

- [38] E. J. Gallagher and D. LeRoith, "Minireview: IGF, insulin, and cancer," *Endocrinology*, vol. 152, no. 7. pp. 2546–2551, 2011.
- [39] D. Sharma, "Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 13, no. 2, pp. 629–640, Jun. 2006.
- [40] H. Moon and C. S. Mantzoros, "Adiponectin and metformin additively attenuate IL1 b -induced malignant potential of colon cancer," 2013.
- [41] F. Miguel, F. Rodrigues, D. Sousa, A. Luísa, S. Costa, R. Lage, R. Soares, and C. Abreu, "Metabolic syndrome and risk of cancer: Which link?," *Metabolism*, pp. 1–8, 2014.
- [42] J. V. Lee, A. Carrer, S. Shah, N. W. Snyder, S. Wei, S. Venneti, A. J. Worth, Z. F. Yuan, H. W. Lim, S. Liu, E. Jackson, N. M. Aiello, N. B. Haas, T. R. Rebbeck, A. Judkins, K. J. Won, L. A. Chodosh, B. A. Garcia, B. Z. Stanger, M. D. Feldman, I. A. Blair, and K. E. Wellen, "Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell Histone acetylation," *Cell Metab.*, vol. 20, no. 2, pp. 306–319, 2014.
- [43] A. L. Harris, "Metabolic compartments in tumor tissue: implications for therapy.," *Cell Cycle*, vol. 11, no. 1, pp. 13–4, Jan. 2012.
- [44] F. Xue and K. B. Michels, "Diabetes, metabolic syndrome, and breast cancer: a review of the current evidence 1– 4," vol. 86, 2007.
- [45] K. a Brown and E. R. Simpson, "Obesity and breast cancer: progress to understanding the relationship.," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 1, pp. 4–7, Jan. 2010.
- [46] K. M. Nieman, I. L. Romero, B. Van Houten, and E. Lengyel, "Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1831, no. 10, pp. 1533–41, Oct. 2013.
- [47] F. M. Mendonça, F. R. de Sousa, A. L. Barbosa, S. C. Martins, R. L. Araújo, R. Soares, and C. Abreu, "Metabolic syndrome and risk of cancer: Which link?," *Metabolism*, vol. 64, no. 2, pp. 182–189, 2015.
- [48] D. Hauner and H. Hauner, "Metabolic Syndrome and Breast Cancer: Is There a Link?," *Breast Care*, vol. 9, pp. 277–281, 2014.
- [49] E. Ritz, "Nephrology beyond," no. 13, pp. 1023–1026, 2007.
- [50] R. J. O. Dowling, S. Niraula, V. Stambolic, and P. J. Goodwin, "Metformin in cancer: translational challenges.," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 48, no. 3, pp. R31-43, Jun. 2012.
- [51] N. M. Kaplan, "The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension.," *Arch. Intern. Med.*, vol. 149, no. 7, pp. 1514–1520, 1989.
- [52] M. P. Stern, K. Williams, C. González-Villalpando, K. J. Hunt, and S. M. Haffner, "Does the metabolic syndrome improve identification of individuals

- at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease?," *Diabetes Care*, vol. 27, no. 11, pp. 2676–2681, 2004.
- [53] S. M. Grundy, "Does the metabolic syndrome exist?," *Diabetes Care*, vol. 29, no. 7, pp. 1689–1692, 2006.
- [54] B. Balkau and M. A. Charles, "Comment on the provisional report from the WHO consultation," *Diabetic Medicine*, vol. 16, no. 5, pp. 442–443, 1999.
- [55] G. Hu, Q. Qiao, J. Tuomilehto, B. Balkau, K. Borch-Johnsen, and K. Pyorala, "Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women.," *Arch. Intern. Med.*, vol. 164, no. 10, pp. 1066–1076, 2004.
- [56] K. G. M. M. Alberti and P. Z. Zimmet, "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation," *Diabet. Med.*, vol. 15, no. 7, pp. 539–553, 1998.
- [57] D. Dunstan, P. Zimmet, T. Welbourne, E. Al, W. David, Z. Paul, a Timothy, D. Courten, and P. Maximilian, "The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance : The ...," *Diabetes Care*, vol. 25, no. May, pp. 829–834, 2002.
- [58] S. Devaraj, R. S. Rosenson, and I. Jialal, "Metabolic syndrome: An appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 33, no. 2, pp. 431–453, 2004.
- [59] P. Zimmet, K. G. Alberti, and J. Shaw, "Global and societal implications of the diabetes epidemic.," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 782–787, 2001.
- [60] V. J. Carey, E. E. Walters, G. a Colditz, C. G. Solomon, W. C. Willett, B. a Rosner, F. E. Speizer, and J. E. Manson, "Body Fat Distribution and Risk of Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus in Women," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 145, no. 7, pp. 614–619, 1997.
- [61] D. B. Carr, K. M. Utzschneider, R. L. Hull, K. Kodama, B. M. Retzlaff, J. D. Brunzell, J. B. Shofer, B. E. Fish, R. H. Knopp, and S. E. Kahn, "Intra-Abdominal Fat Is a Major Determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Criteria for the Metabolic Syndrome," *Diabetes*, vol. 53, no. 8, pp. 2087–2094, 2004.
- [62] M. F. Saad, S. Lillioja, B. L. Nyomba, C. Castillo, R. Ferraro, M. De Gregorio, E. Ravussin, W. C. Knowler, P. H. Bennett, B. V. Howard, and C. Bogardus, "Racial Differences in the Relation between Blood Pressure and Insulin Resistance," *New England Journal of Medicine*, vol. 324, no. 11, pp. 733–739, 1991.
- [63] P. J. Anderson, J. A. Critchley, J. C. Chan, C. S. Cockram, Z. S. Lee, G. N. Thomas, and B. Tomlinson, "Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality.," *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, vol. 25, no. 12, pp. 1782–1788, 2001.



- [64] Centers for Disease Control and Prevention, *Intensive-care patients with severe novel influenza A (H1N1) virus infection - Michigan, June 2009.*, vol. 58, no. 27. 2009.
- [65] Ensanut, "Ensanut 2012." p. 200, 2012.
- [66] S. Barquera Cervera, I. Campos-Nonato, R. Rojas, and J. Rivera, "Obesity in Mexico: epidemiology and health policies for its control and prevention," *Gac. Med. Mex.*, vol. 146, no. 6, pp. 397–407.
- [67] K. N. Phoenix, F. Vumbaca, and K. P. Claffey, "NIH Public Access," vol. 113, no. 1, pp. 101–111, 2009.
- [68] S. O’Rahilly and I. S. Farooqi, "Human obesity as a heritable disorder of the central control of energy balance.," *Int. J. Obes. (Lond).*, vol. 32 Suppl 7, pp. S55–S61, 2008.
- [69] A. Peeters, J. J. Barendregt, F. Willekens, J. P. Mackenbach, A. Al Mamun, L. Bonneux, F. Janssen, A. Kunst, and W. Nusselder, "Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: A life-table analysis," *Ann. Intern. Med.*, vol. 138, no. 1, pp. 24–32, 2003.
- [70] S. Tholin, F. Rasmussen, P. Tynelius, and J. Karlsson, "Genetic and environmental influences on eating behavior: The Swedish Young Male Twins Study," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 3, pp. 564–569, 2005.
- [71] J. M. Wieting, "Cause and effect in childhood obesity: solutions for a national epidemic.," *J. Am. Osteopath. Assoc.*, vol. 108, no. 10, pp. 545–552, 2008.
- [72] G. Marchesini, S. Moscatiello, S. Di Domizio, and G. Forlani, "Obesity-associated liver disease," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 93, no. 11 SUPPL. 1. 2008.
- [73] L. Khaodhiar, K. C. McCowen, and G. L. Blackburn, "Obesity and its comorbid conditions," *Clin. Cornerstone*, vol. 2, no. 3, pp. 17–28, 1999.
- [74] S. B. Wyatt, K. P. Winters, and P. M. Dubbert, "Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem.," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 331, no. 4, pp. 166–174, 2006.
- [75] P. J. Goodwin and V. Stambolic, "Obesity and insulin resistance in breast cancer--chemoprevention strategies with a focus on metformin.," *Breast*, vol. 20 Suppl 3, pp. S31-5, 2011.
- [76] R. J. O. Dowling, P. J. Goodwin, and V. Stambolic, "Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment.," *BMC Med.*, vol. 9, p. 33, 2011.
- [77] X. He, F. J. Esteva, J. Ensor, G. N. Hortobagyi, M.-H. Lee, and S.-C. J. Yeung, "Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer.," *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1771–80, Jul. 2012.
- [78] D. Li, S.-C. J. Yeung, M. M. Hassan, M. Konopleva, and J. L. Abbruzzese,

- “Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer.,” *Gastroenterology*, vol. 137, no. 2, pp. 482–488, 2009.
- [79] P. J. Goodwin, A. M. Thompson, and V. Stambolic, “Diabetes, metformin, and breast cancer: lilac time?,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 23, pp. 2812–4, Aug. 2012.
- [80] A. DeCensi, M. Puntoni, P. Goodwin, M. Cazzaniga, A. Gennari, B. Bonanni, and S. Gandini, “Metformin and cancer risk in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis,” *Cancer Prev. Res.*, vol. 3, no. 11, pp. 1451–1461, 2010.
- [81] J. M. M. Evans, L. A. Donnelly, A. M. Emslie-Smith, D. R. Alessi, and A. D. Morris, “Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients,” *BMJ Br. Med. J.*, vol. 330, no. 7503, pp. 1304–1305, 2005.
- [82] N. F. Col, L. Ochs, V. Springmann, A. K. Aragaki, and R. T. Chlebowski, “Metformin and breast cancer risk: a meta-analysis and critical literature review.,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 135, no. 3, pp. 639–46, Oct. 2012.
- [83] B. Brunmair, K. Staniek, F. Gras, N. Scharf, A. Althaym, R. Clara, M. Roden, E. Gnaiger, H. Nohl, W. Waldhäusl, and C. Fürnsinn, “Thiazolidinediones, Like Metformin, Inhibit Respiratory Complex I: A Common Mechanism Contributing to Their Antidiabetic Actions?,” *Diabetes*, vol. 53, no. 4, pp. 1052–1059, 2004.
- [84] M. Y. El-Mir, V. Nogueira, E. Fontaine, N. Avéret, M. Rigoulet, and X. Leverve, “Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 1, pp. 223–228, 2000.
- [85] B. B. Kahn, T. Alquier, D. Carling, and D. G. Hardie, “AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism,” *Cell Metabolism*, vol. 1, no. 1, pp. 15–25, 2005.
- [86] Y. C. Long and J. R. Zierath, “AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 7, pp. 1776–1783, 2006.
- [87] M. T. M. Redaniel, M. Jeffreys, M. T. May, Y. Ben-Shlomo, and R. M. Martin, “Associations of type 2 diabetes and diabetes treatment with breast cancer risk and mortality: a population-based cohort study among British women.,” *Cancer Causes Control*, vol. 23, no. 11, pp. 1785–95, Nov. 2012.
- [88] S. Bo, A. Benso, M. Durazzo, and E. Ghigo, “Does use of metformin protect against cancer in Type 2 diabetes mellitus?,” *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 35, no. 2, pp. 231–5, Feb. 2012.
- [89] M. Zakikhani, M.-J. Blouin, E. Piura, and M. N. Pollak, “Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells.,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 123, no. 1, pp. 271–9, Aug. 2010.
- [90] D. G. Hardie, “The LKB1-AMPK pathway-friend or foe in cancer?,” *Cancer*

*Cell*, vol. 23, no. 2, pp. 131–2, Feb. 2013.

- [91] Y. Ishibashi, T. Matsui, M. Takeuchi, and S. Yamagishi, “Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced growth and VEGF expression in MCF-7 breast cancer cells by suppressing AGEs receptor expression via AMP-activated protein kinase.,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 45, no. 5, pp. 387–90, May 2013.
- [92] R. J. Shaw, K. a Lamia, D. Vasquez, S. Koo, N. Bardeesy, R. a Depinho, M. Montminy, and L. C. Cantley, “The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin.,” *Science*, vol. 310, no. 5754, pp. 1642–1646, 2005.
- [93] Y. Shu, S. a S. Sheardown, C. Brown, R. P. Owen, S. Zhang, R. a Castro, A. G. Ianculescu, L. Yue, J. C. Lo, E. G. Burchard, C. M. Brett, and K. M. Giacomini, “Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action,” *J. Clin. ...*, vol. 117, no. 5, pp. 1422–31, 2007.
- [94] H. E. Jin, S. S. Hong, M. K. Choi, H. J. Maeng, D. D. Kim, S. J. Chung, and C. K. Shim, “Reduced antidiabetic effect of metformin and down-regulation of hepatic oct1 in rats with ethynylestradiol-induced cholestasis,” *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 3, pp. 549–559, 2009.
- [95] M. V Tzvetkov, S. V Vormfelde, D. Balen, I. Meineke, T. Schmidt, D. Sehart, I. Sabolić, H. Koepsell, and J. Brockmöller, “The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin.,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 86, no. 3, pp. 299–306, 2009.
- [96] C. Campagnoli, F. Berrino, E. Venturelli, C. Abbà, N. Biglia, T. Brucato, P. Cogliati, S. Danese, M. Donadio, G. Zito, and P. Pasanisi, “Metformin decreases circulating androgen and estrogen levels in nondiabetic women with breast cancer.,” *Clin. Breast Cancer*, vol. 13, no. 6, pp. 433–8, Dec. 2013.
- [97] M. Zakikhani, M.-J. Blouin, E. Piura, and M. N. Pollak, “Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells.,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 123, no. 1, pp. 271–9, Aug. 2010.
- [98] L. Wu, X. Huang, C. Yang, S. Deng, M. Qian, Y. Zang, and J. Li, “5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates progesterone receptor transcriptional activity in breast cancer cells.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 416, no. 1–2, pp. 172–7, Dec. 2011.
- [99] G. Z. Rocha, M. M. Dias, E. R. Ropelle, F. Osório-Costa, F. a Rossato, A. E. Vercesi, M. J. a Saad, and J. B. C. Carvalheira, “Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 12, pp. 3993–4005, Jun. 2011.
- [100] D. M. Gwinn, D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk, and R. J. Shaw, “AMPK Phosphorylation of Raptor

- Mediates a Metabolic Checkpoint,” *Mol. Cell*, vol. 30, no. 2, pp. 214–226, 2008.
- [101] M. Foretz, S. Hébrard, J. Leclerc, E. Zarrinpashneh, M. Soty, G. Mithieux, K. Sakamoto, F. Andreelli, and B. Viollet, “Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state,” *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 7, pp. 2355–2369, 2010.
- [102] A. Kalender, A. Selvaraj, S. Y. Kim, P. Gulati, S. Brûlé, B. Viollet, B. E. Kemp, N. Bardeesy, P. Dennis, J. J. Schlager, A. Marette, S. C. Kozma, and G. Thomas, “Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner,” *Cell Metab.*, vol. 11, no. 5, pp. 390–401, 2010.
- [103] J. A. Menendez, C. Oliveras-Ferraros, S. Cufí, B. Corominas-Faja, J. Joven, B. Martin-Castillo, and A. Vazquez-Martin, “Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells.,” *Cell Cycle*, vol. 11, no. 15, pp. 2782–92, Aug. 2012.
- [104] I. Ben Sahra, Y. Le Marchand-Brustel, J.-F. Tanti, and F. Bost, “Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug?,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 9, no. 5, pp. 1092–9, May 2010.
- [105] B. Corominas-Faja, R. Quirantes-Piné, C. Oliveras-Ferraros, A. Vazquez-Martin, S. Cufí, B. Martin-Castillo, V. Micol, J. Joven, A. Segura-Carretero, and J. A. Menendez, “Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs.,” *Aging (Albany. NY.)*, vol. 4, no. 7, pp. 480–98, Jul. 2012.
- [106] B. Bao, Z. Wang, S. Ali, A. Ahmad, A. S. Azmi, S. H. Sarkar, S. Banerjee, D. Kong, Y. Li, S. Thakur, and F. H. Sarkar, “Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells.,” *Cancer Prev. Res. (Phila.)*, vol. 5, no. 3, pp. 355–64, Mar. 2012.
- [107] K. Birsoy, D. M. Sabatini, and R. Possemato, “Untuning the tumor metabolic machine: Targeting cancer metabolism: a bedside lesson,” *Nature Medicine*, vol. 18, no. 7, pp. 1022–1023, 2012.
- [108] K. Basen-Engquist and M. Chang, “Obesity and Cancer Risk: Recent Review and Evidence,” *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 13, no. 1, pp. 71–76, Feb. 2011.
- [109] C. Oliveras-Ferraros, S. Cufí, A. Vazquez-Martin, O. J. Menendez, J. Bosch-Barrera, B. Martin-Castillo, J. Joven, and J. A. Menendez, “Metformin rescues cell surface major histocompatibility complex class I (MHC-I) deficiency caused by oncogenic transformation.,” *Cell Cycle*, vol. 11, no. 5, pp. 865–70, Mar. 2012.
- [110] P. J. Goodwin, K. I. Pritchard, M. Ennis, M. Clemons, M. Graham, and I. G. Fantus, “Insulin-lowering effects of metformin in women with early breast cancer.,” 2008.

- [111] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman, "Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance.," *Science*, vol. 259, no. 5091, pp. 87–91, 1993.
- [112] M. Olszanecka-Glinianowicz, B. Zahorska-Markiewicz, J. Janowska, and A. Zurakowski, "Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity," *Metabolism*, vol. 53, no. 10, pp. 1268–1273, Oct. 2004.
- [113] P. Trayhurn and I. S. Wood, "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue," *Br. J. Nutr.*, vol. 92, no. 3, p. 347, 2004.
- [114] K. A. Negrin, R. J. Roth Flach, M. T. DiStefano, A. Matevossian, R. H. Friedline, D. Jung, J. K. Kim, and M. P. Czech, "IL-1 Signaling in Obesity-Induced Hepatic Lipogenesis and Steatosis," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, p. e107265, Sep. 2014.
- [115] G. E. Carpagnano, A. Spanevello, C. Curci, F. Salerno, G. P. Palladino, O. Resta, G. Di Gioia, F. Carpagnano, and M. P. Foschino Barbaro, "IL-2, TNF- $\alpha$ , and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients," *Oncol Res*, vol. 16, no. 8, pp. 375–381, 2007.
- [116] M. J. Martin, R. Hayward, A. Viros, and R. Marais, "Metformin Accelerates the Growth of BRAFV600E-Driven Melanoma by Upregulating VEGF-A," *Cancer Discov.*, vol. 2, no. 4, pp. 344–355, Apr. 2012.
- [117] K. Dallaglio, A. Bruno, A. R. Cantelmo, A. I. Esposito, L. Ruggiero, S. Orecchioni, A. Calleri, F. Bertolini, U. Pfeffer, D. M. Noonan, and A. Albini, "Paradoxical effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis," *Carcinogenesis*, vol. 35, no. 5, pp. 1055–1066, May 2014.
- [118] T. Tzanavari, P. Giannogonas, and K. P. Karalis, "TNF- $\alpha$  and Obesity," in *TNF Pathophysiology*, Basel: KARGER, 2010, pp. 145–156.
- [119] S. M. Carlsen, A. Waage, V. Grill, and I. Følling, "METFORMIN INCREASES CIRCULATING TUMOUR NECROSIS FACTOR  $\alpha$  LEVELS IN NON-OBESE NON-DIABETIC PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE," *Cytokine*, vol. 10, no. 1, pp. 66–69, Jan. 1998.
- [120] R. M. Memmott and P. a. Dennis, "LKB1 and mammalian target of rapamycin as predictive factors for the anticancer efficacy of metformin," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 34, p. 2015, 2009.
- [121] M. Pollak, "Metformin and other biguanides in oncology: Advancing the research agenda," *Cancer Prev. Res.*, vol. 3, no. 9, pp. 1060–1065, 2010.
- [122] K. Bhalla, B. Hwang, R. E. Dewi, W. Twaddel, O. G. Goloubeva, K. K. Wong, N. K. Saxena, S. Biswal, and G. D. Girnun, "Metformin prevents liver tumorigenesis by inhibiting pathways driving hepatic lipogenesis," *Cancer Prev. Res.*, vol. 5, no. 4, pp. 544–552, 2012.
- [123] D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, and J. D. Lambris, "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis," *Nat. Immunol.*, vol.

11, no. 9, pp. 785–797, Sep. 2010.

- [124] X. Bu, Z. Zheng, C. Wang, and Y. Yu, “Significance of C4d deposition in the follicular lymphoma and MALT lymphoma and their relationship with follicular dendritic cells,” *Pathol. - Res. Pract.*, vol. 203, no. 3, pp. 163–167, Mar. 2007.
- [125] R. Pio, D. Ajona, and J. D. Lambris, “Complement inhibition: a promising concept for cancer treatment,” *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [126] A. Gorter and S. Meri, “Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins,” *Immunol. Today*, vol. 20, no. 12, pp. 576–582, Dec. 1999.
- [127] C. Pomeroy, J. Mitchell, E. Eckert, N. Raymond, R. Crosby, and a P. Dalmasso, “Effect of body weight and caloric restriction on serum complement proteins, including Factor D/adipsin: studies in anorexia nervosa and obesity.,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 108, no. 3, pp. 507–515, 1997.
- [128] J. Warnberg, E. Nova, L. A. Moreno, J. Romeo, M. I. Mesana, J. R. Ruiz, F. B. Ortega, M. Sjostrom, M. Bueno, and A. Marcos, “Inflammatory proteins are related to total and abdominal adiposity in a healthy adolescent population: the AVENA Study,” *Am. J. ...*, vol. 84, no. 3, pp. 502–512, 2006.
- [129] J. Zhang, W. Wright, D. a Bernlohr, S. W. Cushman, and X. Chen, “Alterations of the classic pathway of complement in adipose tissue of obesity and insulin resistance.,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 292, no. 5, pp. E1433–E1440, 2007.
- [130] W. Deng, C. Li, Y. Zhang, J. Zhao, M. Yang, M. Tian, L. Li, Y. Zheng, B. Chen, and G. Yang, “Serum C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) levels are decreased in obesity and hypertension and are negatively correlated with parameters of insulin resistance,” *Diabetol. Metab. Syndr.*, vol. 7, no. 1, p. 33, Dec. 2015.
- [131] B. K. Tan, J. Chen, J. Hu, O. Amar, H. S. Mattu, R. Adya, V. Patel, M. Ramanjaneya, H. Lehnert, and H. S. Randeva, “Metformin Increases the Novel Adipokine Cartonectin/CTRP3 in Women With Polycystic Ovary Syndrome,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 12, pp. E1891–E1900, 2013.
- [132] A. M. Carter, C. E. Bennett, J. A. Bostock, and P. J. Grant, “Metformin reduces C-reactive protein but not complement factor C3 in overweight patients with Type 2 diabetes mellitus,” *Diabet. Med.*, vol. 22, no. 9, pp. 1282–1284, Sep. 2005.
- [129] Calixto, Marina Ciarallo, et al. Metformin attenuates the exacerbation of the allergic eosinophilic inflammation in high fat-diet-induced obesity in mice. 2013.
- [130] COLEMAN, John M., et al. Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. Thorax,

2012, p. thoraxjnl-2012-201634.

## **Anexos**

### **Anexo I. Criterios de inclusión y exclusión del Programa de Atención al Paciente con Obesidad**

#### Criterios de inclusión

- 1.- IMC mayor a 35 con Síndrome metabólico.
- 2.- Edad de 18 a 60 años.
- 3.- Edad mayor a 61 años con criterios Edmonton 0, 1 y 2.
- 4.- Escolaridad mínima de primaria completa.
- 5.- Pacientes que puedan acudir a sus citas programadas de forma mensual-

#### **Criterios de exclusión:**

- 1.- Todo paciente mayor 18 años con criterios de Edmonton 3 y 4
- 2.- Pacientes con enfermedad terminal
- 3.- Pacientes con cirrosis hepática (Child Pugh c)
- 4.- Deseo de cirugía bariátrica
- 5.- Síntomas severos de depresión o ansiedad
- 6.- Pacientes con retraso psicomotor o padecimientos psiquiátricos.
- 7.- Enfermedades concomitantes graves.



## **Anexo II. Consentimiento informado.**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:  
EFECTO DEL SUERO DE PACIENTES TRATADAS CON METFORMINA SOBRE VIABILIDAD Y  
MOTILIDAD EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA  
MÉXICO D.F A 20 MARZO DE 2014 VERSIÓN 2**

**Investigador principal: Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

**Dirección del investigador: INCMNSZ Vasco de Quiroga No 15 Col. Sección VXI C.P. 14000**

**Teléfono de contacto del: 54870900 ext- 2606 y 2607**

**Investigadores participantes: Dr. Eduardo García García, Dr. Juan Pablo Méndez Blanco, Dra. Alejandra Armengol Alonso, M. en C José Luis Ventura Gallegos y Q.F.B Javier Hernández Juárez**

**Nombre del patrocinador del estudio: Presupuesto Institucional INCMNSZ & I.I.B UNAM**

**Dirección del patrocinador: Vasco de Quiroga No 15 Col. Sección VXI C.P. 14000**

**Versión del consentimiento informado y fecha de su preparación: Versión 2, México D.F 20 de Marzo de 2014,**

### **INTRODUCCIÓN:**

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, la Declaración de Helsinki y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios con el fin tomar una decisión informada. Este formato de consentimiento informado le dará información detallada acerca del estudio de investigación que podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Procedimiento para dar su consentimiento: Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar en esta investigación, y se puede solicitar todo el tiempo que requiera para considerar esta invitación. El investigador le explicará ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y tendrá todo el tiempo que requiera para pensar solo o con usted decida consultarlo para decirle al investigador acerca de su decisión. Esta decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto. Al final de esta explicación, usted debe entender los puntos siguientes:

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de que son procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
- IV. Los beneficios que se pueden observar.
- V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.
- VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre

- los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
- VII. La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello los prejuicios se cree que continuar con la atención y el tratamiento.
  - VIII. La seguridad de que no va a identificar al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
  - IX. El compromiso de proporcionar información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esto podría afectar a la disposición para continuar su participación.
  - X. La disponibilidad de tratamiento médico y compensación legalmente derecho, la institución de atención de la salud en el caso de daños a la orden, directamente causado por la investigación. Sin embargo, es su derecho de solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de dar una decisión final en los días futuros.

## **INVITACION A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

Estimado Sr.(a) \_\_\_\_\_

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán le invitan a participar en este estudio de investigación que tiene como objetivo: Analizar el efecto de su sangre antes y después de iniciar la toma de metformina sobre células de cáncer de mama en cultivo.

Estudios previos sugieren que en mujeres obesas que recibieron metformina se presentan sustancias en la sangre que afectan negativamente el crecimiento de células de cáncer de mama.

Su participación requiere de tres consultas cada 10 semanas. El de estudio requiere de 48 individuos.

Usted fue invitado al estudio debido a que usted padece obesidad. El programa de atención al paciente obeso (PAPO) le otorgará de forma gratuita metformina para ayudar a controlar su concentración de glucosa en sangre. Aunque este es un estudio usa cultivos de células de cáncer de mama, es importante dejar claro que usted no padece cáncer, el estudio solo se enfoca en su IMC y el tratamiento con metformina.

### **PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

El tratamiento que será evaluado es la toma de metformina en un periodo de 20 semanas. La muestra tomada antes de iniciar el tratamiento será comparada con las dos muestras tomadas a las 10 y 20 semanas de tomar la metformina.

Su probabilidad para ser asignado a uno de los grupos antes mencionado es: 100%

Su participación en el estudio consiste en: Tomar metformina por un periodo de 20 semanas. En el momento que usted decida participar en el estudio se le tomará una muestra sanguínea de 20mL, así como también a las 10 y 20 semanas después de iniciar el tratamiento, lo cual requerirá su presencia nuevamente en el INCMNSZ.

Los procedimientos del estudio incluyen la realización de: Obtención de suero de su sangre tomada antes del tratamiento con metformina. Posteriormente, se obtendrán sueros a las 10 y 20 semanas de tratamiento. Se probará si el suero de cada una de sus tres muestras afecta el crecimiento, movilidad y la sensibilidad a morir de células de cáncer de mama.

La única intervención propuesta es la toma de metformina.

Es importante que usted sepa que la metformina se ha administrado anteriormente a pacientes obesos en forma segura por lo que no afectará sus capacidades físicas. Las responsabilidades de los participantes incluyen: Tomar la metformina de acuerdo al tiempo y dosis indicados y hacer tres donaciones de 20 mL sangre. La primera donación se hará antes de iniciar al consumo de metformina, la segunda y tercera donaciones serán 10 y 20 semanas después.

### **RIESGOS E INCONVENIENTES**

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos de complicaciones.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

### **BENEFICIOS POTENCIALES**

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, permite buscar e identificar factores biológicos que expliquen por qué las mujeres con obesidad que toman metformina presentan protección contra el cáncer de mama. Esto puede hacer posible un tratamiento personalizado de esta enfermedad e identificar nuevos posibles tratamientos. Además, gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de atender esta complicación médica.

### **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

### **COMPENSACION**

Si sufre lesiones como resultado de su participación en este estudio, nosotros le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, en caso de ameritarlo, al especialista médico que requiera. No contamos con presupuesto para financiar compensaciones por lesiones. El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán no brinda ningún tipo adicional de compensación para cubrir el daño.

### **ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:**

Su participación es voluntaria. Sin embargo, usted puede elegir no participar en el estudio. Por ser un sujeto sano, no requiere estudios o acciones terapéuticas adicionales.

### **POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:**

Los materiales serán propiedad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ). Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero.

### **ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:**

Debido a que es un estudio experimental no tiene traducción clínica para usted.

### **PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:**

Su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) o su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ). Se le informará a tiempo si nueva información es obtenida que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio.

El investigador o el patrocinador del estudio puede excluirlo del estudio si presenta otras alteraciones como son: infecciones severas, traumatismo e intoxicaciones.

El estudio puede ser terminado en forma prematura si dificultades económicas se presentan para mantener operando el estudio.

Los procedimientos que serán necesarios si usted termina su participación en el estudio son: Ninguno

### **CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN**

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas, así como su información médica y/o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que no estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto. Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 4 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Solo los investigadores tendrán acceso. No existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio. Su confidencialidad será protegida como lo marca la ley. Será mantenida asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o
- Es solicitado por la ley.

Monitores o auditores del estudio podrán tener acceso a la información de los participantes.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

El Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición aprobó la realización de éste estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueban y supervisa

los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de ética que supervisan este estudio para que decidamos la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice recontactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio

### **IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:**

En caso de que usted sufra un daño relacionado al estudio, por favor póngase en contacto con el Dr. Eduardo García García, Jefe de la Unidad de Obesidad y Trastornos Alimentarios en el INCMNSZ teléfono: 54870900 ext. 5535

Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con el Dr. Alejandro Zentella Dehesa Coordinador de la Unidad de Bioquímica en el INCMNSZ tel.: 54870900 ext. 2606 y 2607

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Carlos A. Aguilar Salinas. Teléfono: 54870900 ext. 6101).

### **DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas Muestra sanguínea para ser utilizadas en éste estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas

	<b>SÍ (marque por favor)</b>	<b>NO (marque por favor)</b>
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. <b>Si aplica:</b> ¿Autoriza se dé acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios a _____, sus representantes, los auditores, oficinas regulatorias del estudio, otras agencias gubernamentales de la salud en México y posiblemente otras agencias gubernamentales de la salud en otros países en donde se pueda considerar al fármaco en estudio para la aprobación de su comercialización?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
k. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no siguió los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
l. <b>Si aplica</b> ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**(El presente documento es original y consta de 6 páginas)**

**Declaración** \_\_\_\_\_ **del** \_\_\_\_\_ **paciente:** \_\_\_\_\_ Yo, que declaro

es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto el Dr. Alejandro Zentella Dehesa Coordinador de la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ tel.: 54870900 ext. 2606. Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante en el estudio, problemas, preocupaciones o preguntas, obtener información, y ofrecer información que puede hablar con el Presidente del Comité de Ética de Investigación de INCMNSZ (Dr. Carlos A. Aguilar Salinas Tel: 54870900. ext. 6101). Debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud (por ejemplo, uso de nuevos medicamentos, cambios en el consumo de tabaco) o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible. He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Nombre del Participante	Firma del Participante	Fecha

Coloque su huella digital si no sabe escribir

Nombre del representante legal (si aplica)	Firma del representante legal	Fecha

Nombre del Investigador que explicó el documento	Firma del Investigador	Fecha

Nombre del Testigo 1	Firma del Testigo 1	Fecha
Relación participante: _____ con _____		el _____

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre del Testigo 2

Firma del Testigo 2

Fecha

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Relación que guarda con el participante: \_\_\_\_\_

Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

**(El presente documento es original y consta 2 páginas)**



**Anexo III. Comparación de la actividad de sueros humanos después de dos ciclos de congelación, concentración de suero y activación e inactivación del complemento.**

### MCF-7

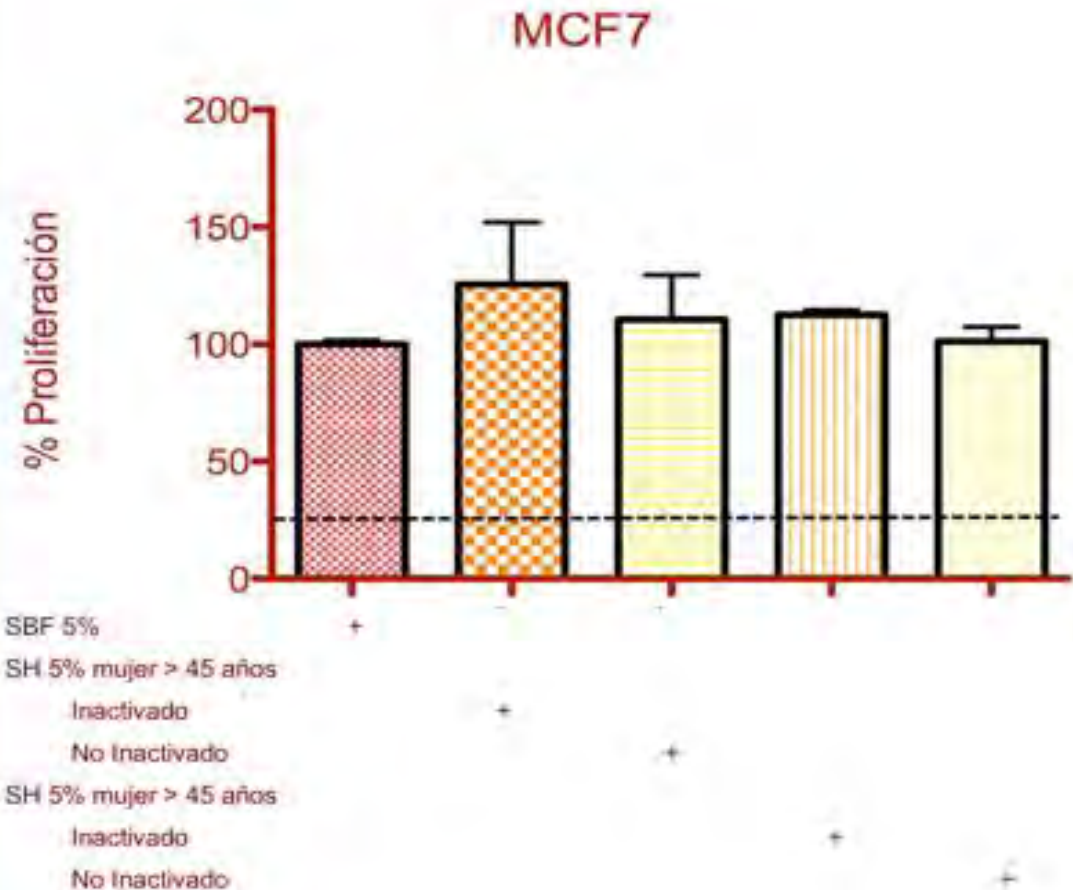
Se evaluó la proliferación de muestras de individuo normales:

1. Mujer > 45 años
2. Mujer < 45 años

También se evaluó la influencia del complemento sobre la proliferación celular

**Observaciones:** Este experimento sugiere que el suero humano es más proliferativo que el SBF al 5%

La actividad del complemento no afecta la proliferación celular.



## MCF-7

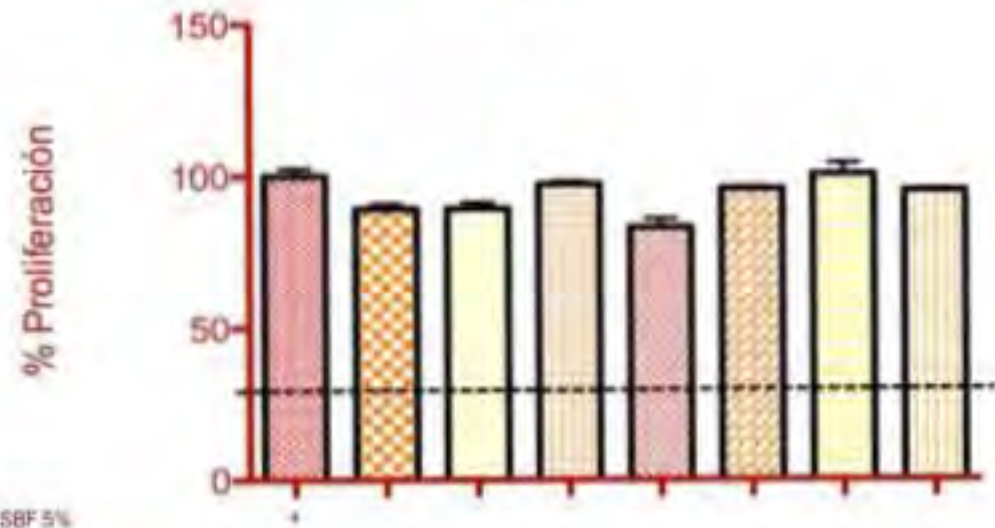
Se evaluó la proliferación de muestras pacientes H y M con Met a dos concentraciones 2.5% y 5% de suero con 3 ciclos de descongelación

También se evaluó la influencia del complemento sobre la proliferación celular

**Observaciones:** Este experimento sugiere que el suero con metformina de paciente femenino es menos proliferativo que el SBF al 5%. Por otra parte el suero H es igual de proliferativo que el SBF 5%. El suero del individuo femenino normal después de 3 ciclos de descongelación pierde actividad proliferativa

La actividad del complemento no afecta la proliferación celular.

## MCF7



SBF 5%

SC 5% Inactivado

Suero H con Met

2.5% No inactivado

5% No inactivado

Suero M con Met

2.5% No inactivado

5% No inactivado

Suero H con Met 5%

Inactivado

Suero M con Met 5%

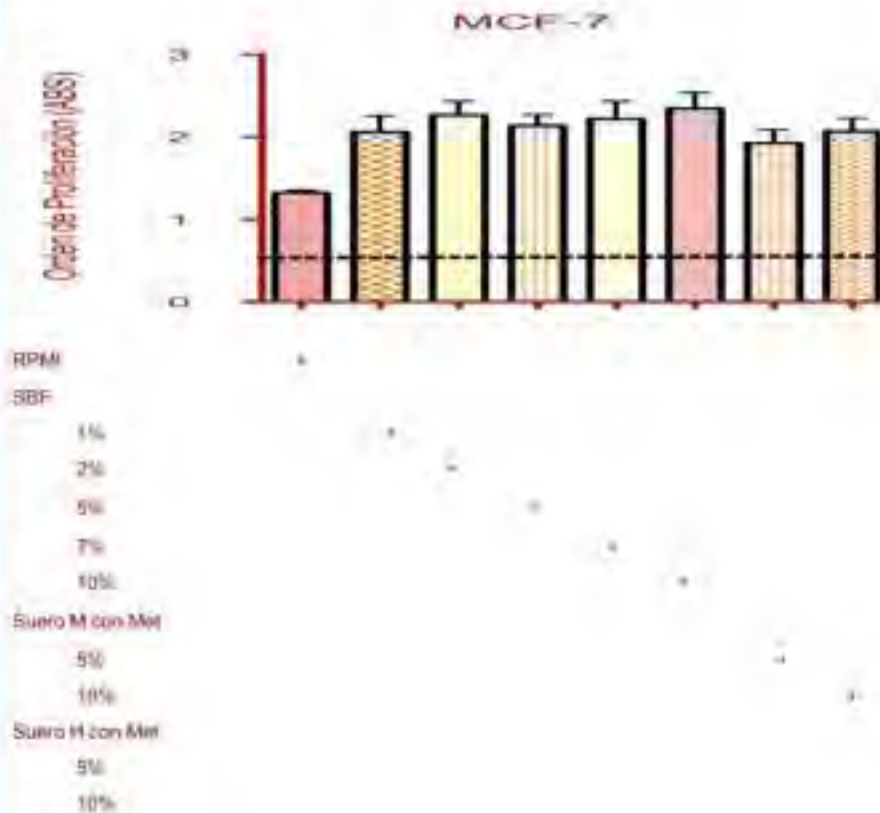
Inactivado

## MCF-7

Se evaluó la proliferación de muestras pacientes H y M con Met a dos concentraciones 5 y 10 de suero con 1 semana de refrigeración

También se evaluó una curva de proliferación con SBF para ver la diferencia entre concentraciones.

**Observaciones:** Este experimento sugiere que el suero con metformina de paciente femenino es menos proliferativo que el SBF al 10%. Por otra parte el suero H es igual de proliferativo que el SBF 5%. El suero del individuo



#### **Anexo IV. Técnica de cristal violeta.**

Después de concluir el ensayo de proliferación los pozos que contienen las células tumorales son lavados con amortiguador de fosfatos PBS p=7.0 dos veces.

Posteriormente se realiza la fijación de las células contenidas en los pozos mediante la adición de una solución 1.1% V/V de glutaraldehído y medio de cultivo. La fijación de las células se lleva a cabo durante 20 minutos.

El glutaraldehído se retira y se lavan los pozos de nuevo con PBS para quitar el exceso.

Las células se dejan secar para remover cualquier residuo de volumen. Entonces, se le agrega 150 micro litros de Cristal violeta por pozo y se deja en agitación durante 5 minutos. Se lava el exceso de cristal violeta para entonces las células ya se han teñido.

Se deja secar para eliminar cualquier tipo de volumen residual.

Se agregan 500 micro litros de una solución de ácido acético/agua al 10% esto hará que el cristal violeta salga de la célula y se disuelva en el ácido. Se deja en agitación 30 minutos.

Concluido el tiempo, se lee la solución ácido acético/cristal violeta por espectrofotometría a 595 nm de longitud de onda.

Los resultados se expresan en densidades ópticas y se convierten en porcentajes de proliferación comparados con el control positivo y negativo

## Anexo V. Concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento obesidad grado I.

Concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en mujeres y hombres  
Obesidad Grado I

Tx (sem)	Grado I n=3									individuos con IMC < 30 kg/m <sup>2</sup>	
	3 Factores de SMet HOMA > 3			2 Factores de SMet HOMA > 3			1 Factor de SMet HOMA < 3			M	H
	T0	M n=1 T10	T20	T0	M n=1 T10	T20	T0	H n=1 T10	T20		
<b>VEGF</b>	<b>52.4*</b>	<b>52.4*</b>	<b>154*</b>	52.4	52.4	52.4	<b>673*</b>	<b>350</b>	<b>350</b>	52.4	52.4
<b>IL-6</b>	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6
<b>TNF-a</b>	22.2	22.1	21.1	7.0	3.0	8.0	18.1	13	13	7.1	5.0
<b>IL-1b</b>	<b>16.6*</b>	<b>10*</b>	<b>9*</b>	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
<b>IL-12p (40)</b>	93	39	80	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6
<b>IL-7</b>	3	8.2	8.1	1.2	1.2	1.2	28.2	31	21	1.8	1.8
<b>IL-2</b>	<b>10*</b>	<b>1.8*</b>	<b>1.8*</b>	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
<b>Eotaxina</b>	215	245	280	100.0	120.0	100.0	113	112	135	78.9	162.3
<b>IP-10</b>	284	230	240	640.0	520.0	600.0	478	642	846	258.2	306.7
<b>MCP-1</b>	830	659	801	560.0	440.0	400.0	295	642	848	314.0	618.8
<b>MIP-1a</b>	5.6	5.6	5.6	5,6	5,6	5,6	4	2.8	2.8	5.6	5.6
<b>MIP-1b</b>	95.4	80	90	70.0	50.0	46.0	66	52	96	6.3	27.2

## Anexo VI. Concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento obesidad grado III.

### Concentración de citocinas y quimiocinas en mujeres y hombres Obesidad Grado III

Tx sem	Grado III n=3									Individuos con IMC < 30 kg/m <sup>2</sup>	
	3 Factores de SMet HOMA > 3			3 Factores de SMet HOMA < 3			1 Factor de SMet HOMA < 3			M	H
	M	M	H	M	M	H	M	M	H		
	T0	T10	T20	T0	T10	T20	T0	T10	T20		
VEGF	52.4	52.4	52.4	226.0	52.4	52.4	221.0	52.4	52.4	52.4	52.4
IL-6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
TNF-a	<b>25*</b>	<b>14*</b>	<b>14*</b>	<b>22*</b>	<b>16*</b>	<b>14*</b>	17.9	16.6	18.7	7.1	5.0
IL-1b	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
IL-12p (40)	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6
IL-17	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
IL-2	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Exentan	120.0	105.0	160.0	<b>120.0</b>	<b>84.0</b>	<b>74.0</b>	<b>353.6</b>	<b>555.1</b>	<b>52.4</b>	78.9	162.3
IP-10	475.0	306.0	476.0	413.0	286.8	390.9	487.2	555.5	486.7	258.2	306.7
MCP-1	835.0	659.0	814.0	640.0	505.2	585.6	601.1	833.9	1015.0	314.0	618.8
MIP-1a	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
MIP-1b	90.0	74.0	90.0	30.8	35.0	40.5	56.8	91.7	49.1	6.3	27.2

**Anexo VII. Tabla representativa de datos de hombres y mujeres analizados.**

Grupo	Género	Código interno	Código de asignación	Peso inicial (Kg)	Peso final (Kg)	ΔPeso	Dosis de metformina (mg)	% Apego	α
I	♂	MI1	1	78.9	75.5	3.4	1700	96%	Malestar intestinal
		MI2	2	82.7	78.9	3.8	2550	100%	No presentó
		MI3	3	98.3	91.6	6.7	1700	87%	Diarrea
		MI4	4	70	63.8	6.2	2550	100%	
		MI5	5	77.4	73.3	4.1	1700	Sin datos	
	♀	HI1	6	89.5	30.61	58.89	1700	93%	Malestar intestinal
		HI2	7	100.1	85.6	14.5	2550	100%	
		HI3	8	107	92.8	14.2	1700	Sin datos	
		HI4	9	83.4	101.9	-18.5	1700	Sin datos	
		HI5	10	103.4	80.4	23	2550	78%	Diarrea, nauseas
III	♂	MIII1	12	99.9	97.7	2.2	2550	93%	Dolor de cabeza
		MIII2	13	129.5	74.6	54.9	2550	Sin datos	
		MIII3	14	98.3	89.45	8.85	1700	100%	
		MIII4	15	96.5	96.1	0.4	2550	95%	Malestar intestinal
		MIII5	16	109.1	107.7	1.4	2550	79%	Malestar intestinal
		MIII6	17	86.1	81.35	4.75	2550	81%	Dolor de cabeza
		MIII7	18	112	103.5	8.5	1700	Sin datos	
	♀	HIII1	19	136.5	123.2	13.3	2550	100%	
		HIII2	20	118.1	115.7	2.4	2550	71%	Malestar intestinal
		HIII3	21	133.5	127	6.5	2550	80%	Diarrea
		HIII4	22	115.6	109.1	6.5	2550	74%	Nauseas

**M=** mujer, **H=** hombre, **I, II, III=** grado de obesidad, **numeral=** número de individuo que ingresó al protocolo, **α=** efectos secundarios de metformina, **%apego =** (número de tabletas asignadas/ tabletas tomadas totales) x 100