



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LA IRISINA, EN CÁNCER DE MAMA
INFILTRANTE NO HEREDITARIO, EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS CON
ÍNDICES DIFERENTES DE MASA CORPORAL”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Médico María Elena Tejeda Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Pablo Méndez Blanco
División de Investigación, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Armando Tovar Palacio
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme otorgado una beca durante la realización de mis estudios de Maestría (número de registro CVU/Becario: 661657).

Al Instituto de Enfermedades de la Mama, FUCAM y al Dr. Alberto Tenorio Torres, por permitirme llevar a cabo este estudio con la participación de mujeres pacientes de este Instituto.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), por la donación de las líneas celulares empleadas para la realización de este estudio.

Al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por otorgarme una beca para la asistencia al XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, en el cual se presentó este trabajo en la modalidad de presentación oral.

Este trabajo fue apoyado económicamente para su desarrollo por la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Juan Pablo Méndez Blanco por la oportunidad de trabajar bajo su tutoría, así como por el apoyo, orientación y confianza otorgada.

A la Dra. Patricia Canto Cetina por su contribución, gran apoyo y valioso asesoramiento en cada uno de los aspectos que me permitieron llevar a cabo esta Maestría.

Al Dr. Ramón Coral Vázquez, por sus observaciones y aportaciones que mejoraron la calidad de la técnica en este proyecto. Así mismo, por haber sido mi primer maestro de Biología Molecular, le agradezco por compartir su gusto e interés por la ciencia.

A la Dra. Verónica Bautista Piña, por hacer factible la obtención de muestras tumorales en el Departamento de Patología del FUCAM, así como por sus observaciones, y correcciones durante la estandarización de la técnica.

Al Departamento de Patología del FUCAM, especialmente al Técnico Héctor Trinidad por sus aportaciones en la estandarización de la técnica.

A la Dra. Claudia Vega García del INCMNSZ, por dedicar su tiempo y paciencia, así como su amplio conocimiento en el trabajo de laboratorio. Por siempre mantener una actitud muy colaboradora y resolver todas mis dudas sobre las técnicas y procesos en el laboratorio.

A la Dra. Brenda Marquina Castillo del Laboratorio de Patología Experimental del INCMNSZ, por permitirme llevar a cabo la técnica de inmunohistoquímica en el área adecuada para su trabajo.

A los Técnicos Gabriela y Ricardo Aguilar del INCMNSZ, por haber llevado a cabo los cortes de todas las laminillas y siempre realizarlo de la mejor manera.

Al Maestro José Luis Ventura Gallegos del Departamento de Bioquímica del INCMNSZ, por instruirme en el adecuado manejo de las líneas celulares.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Armando Tovar Palacio y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, por su tiempo y sus aportaciones para la realización de este estudio.

A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, a la Dra. Nimbe Torres y Torres, a la Dra. Martha Robles Flores y al Dr. Samuel Canizales Quinteros, por revisar este escrito y realizar las correcciones, sugerencias y comentarios pertinentes.

A mis compañeros de laboratorio, Marcela Leal por haberme apoyado en el proceso de inclusión de las mujeres participantes, Eduardo Cárdenas por sus buenas observaciones como médico oncólogo y a Sergio de los Santos por ser un excelente maestro y todos los días ayudarnos en lo que sea necesario.

Agradezco de forma especial:

A mis padres Fausto Tejeda y María Elena Hernández, por creer en mi siempre y apoyarme en absolutamente todas mis decisiones, me han dado una maravillosa vida y me han hecho una persona feliz.

A mi hermana Mónica Tejeda, por siempre ser una inspiración para mi, por su cariño y su apoyo incondicional que me hacen ser una mejor persona.

A Michel Torres, por compartir conmigo todos los días, acompañarme y cuidarme siempre.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado:

A las mujeres con cáncer de mama y al estudio de esta importante patología en México.

Al mejor investigador Fausto Tejeda Trujillo.

Y a una mujer admirable en todos los aspectos María Elena Hernández Ramos.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1. RESUMEN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Obesidad.....	11
2.2 Obesidad y comorbilidad.....	12
2.3 Cáncer de mama.....	14
2.4 Clasificación del cáncer de mama.....	16
2.5 Factores de riesgo para cáncer de mama.....	19
2.6 Obesidad y cáncer de mama en la mujer posmenopáusica	20
2.7 Ambiente tumoral.....	21
2.8 FNDC5/irisina.....	23
2.9 Irisina en cáncer de mama.....	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
5. HIPÓTESIS.....	27
6. DISEÑO METODOLÓGICO.....	28
6.1 Tipo de estudio.....	28
6.2 Sujetos.....	28
7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	30
8. DIAGRAMA METODOLÓGICO.....	31
9. MÉTODOS.....	32

9.1 Obtención de la muestra.....	32
9.2 Técnica de inmunohistoquímica.....	32
9.3 Obtención de imágenes.....	33
9.4 Análisis inmunohistoquímico por software.....	34
9.5 Líneas celulares.....	35
9.6 Cultivo celular.....	36
9.7 Cultivo en laminilla.....	37
9.8 Análisis inmunocitoquímico.....	37
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
11. RESULTADOS.....	39
11.1 Análisis de la expresión de la irisina en tejido tumoral mamario.....	41
11.2 Análisis de expresión de irisina en líneas celulares	42
12. DISCUSIÓN.....	45
13. CONCLUSIONES.....	52
14. BIBLIOGRAFÍA.....	53
15. ANEXOS.....	64
ANEXO 1. Formato de consentimiento informado.....	63
ANEXO 2. Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica	65
ANEXO 3. Control positivo para análisis inmunohistoquímico	66
ANEXO 4. Score histológico por intensidad de marcaje.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión de la irisina en tejido tumoral mamario.....	41
Figura 2. Expresión de la irisina en líneas celulares de CaM.....	43
Figura 3. Estandarización del anticuerpo primario.....	65
Figura 4. Expresión de la irisina en tejido muscular sano.....	66
Figura 5. Zonas asignadas por H-Score.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de estadificación TNM.....	17
Tabla 2. Asignación de estadio clínico para cáncer de mama.....	17
Tabla 3. Subtipos moleculares de cáncer de mama.....	19
Tabla 4. Características de las líneas celulares.....	35
Tabla 5. Características clínicas de las mujeres con CaM	39
Tabla 6. Características histopatológicas de los tumores.....	40
Tabla 7. H-score para la expresión de la irisina en el tejido tumoral mamario.....	42
Tabla 8. H-score para la expresión de la irisina en cultivo celular.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	
CaM	Cáncer de mama
DAB	Diaminobencidina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Delbucco
DM2	Diabetes mellitus 2
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FNDC5	Fibronectina tipo III conteniendo el dominio 5
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
IL6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
PGC1 α	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1 alfa
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UCP1	Proteína desacoplante 1

1. RESUMEN

El incremento en la prevalencia de obesidad constituye uno de los mayores retos para la salud pública. La presencia de obesidad en la mujer posmenopáusica, favorece el desarrollo de cáncer de mama (CaM), asociándose con mal pronóstico del mismo. El tejido adiposo ejerce un potente efecto local para el desarrollo y la progresión del CaM. Por otra parte, se conocen los beneficios que el ejercicio proporciona a individuos con patologías como el cáncer, a través de la secreción de proteínas derivadas del tejido muscular. Recientemente la proteína irisina, la cual es secretada por los tejidos muscular y adiposo, ha demostrado ejercer un efecto antiinflamatorio y antiproliferativo en las células tumorales de CaM.

El objetivo del presente estudio fue comparar la expresión de la irisina en el tejido tumoral mamario de mujeres posmenopáusicas, con diagnóstico de CaM infiltrante, que presentaban índices diferentes de masa corporal. Lo anterior, con el fin de definir la influencia que el incremento de peso pudiese tener sobre la expresión de dicha proteína. Asimismo, se determinó la expresión *in vitro* de la irisina, con el fin de llevar a cabo la valoración de la expresión de forma específica, sin la interferencia del medio extracelular que rodea a la célula tumoral *in vivo*.

Los resultados mostraron, que las mujeres con un IMC de obesidad presentan de forma predominante una expresión positiva para la irisina, en su tejido tumoral mamario ($p= 0.0273$); no siendo así para las mujeres con un IMC normal y de sobrepeso. El estudio *in vitro* reveló que la célula tumoral de CaM, es capaz de expresar esta proteína en una forma independiente del estímulo extracelular que existe en un ambiente *in vivo*.

Podemos concluir, que las células tumorales de CaM, tienen la capacidad de expresar a la irisina y que, ante la presencia de obesidad esta expresión se encuentra aumentada.

2. ANTECEDENTES

2.1. OBESIDAD

La obesidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como la acumulación anormal o excesiva de grasa en un individuo, siendo dicha acumulación perjudicial para la salud (WHO, 2016). El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple, útil y aplicable a ambos sexos de la población adulta, para determinar la presencia de obesidad; el IMC se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos sobre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). Con base en esta medida, se establece la clasificación del IMC en: normal, cuando el IMC es de 20-24.9 kg/m^2 , sobrepeso cuando el IMC es de 25-29.9 kg/m^2 y obesidad cuando el IMC es igual o mayor a 30 kg/m^2 (WHO, 2016).

Los resultados de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, realizada en México en 1993, demostraron que la prevalencia de obesidad en los adultos era de 21.5%; para el año 2000, la prevalencia se incrementó a 24% y en el año 2012, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) indicó una prevalencia de 32.4%. Asimismo, de acuerdo con la última Encuesta Nacional (ENSANUT medio camino 2016), la prevalencia de obesidad en los adultos fue del 33.3%, siendo mayor en la población de mujeres (38.6%) que en la de hombres (27.7%) (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2016).

Con referencia en el informe emitido por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) en 2017, México ocupa el segundo lugar en prevalencia de obesidad en la población adulta a nivel mundial, encontrándose por debajo de Estados Unidos (www.oecd.org/health/obesity-update).

Este exceso en la adiposidad corporal constituye uno de los mayores retos para la salud pública mundial en el siglo XXI. El término de epidemia de obesidad se ha utilizado

para describir el aumento desproporcionado en la prevalencia de esta enfermedad, el cual se ha observado a escala global desde la década de los ochenta del siglo pasado, habiéndose incrementado en forma aún más significativa durante los últimos años.

2.2. OBESIDAD Y COMORBILIDAD

La etiología de la obesidad es compleja y multifactorial, en ella se ven involucrados factores genéticos, ambientales y sociales; dentro de estos últimos, el estilo de vida y de alimentación poseen un papel determinante. Diversos estudios muestran que, en nuestra sociedad actual se ha incrementado el consumo de alimentos ricos en azúcares y grasas saturadas, acompañándose lo anterior de una baja actividad física o vida sedentaria entre los individuos que los consumen, lo que promueve un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, contribuyendo al aumento desproporcionado en la incidencia y la prevalencia de obesidad (Zobel y cols., 2016; González-Muniesa y cols., 2017).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la obesidad se asocia con un mayor riesgo de morbilidad, discapacidad y mortalidad (Martin-Rodríguez y cols., 2015; Wong y cols., 2015). Asimismo, se ha establecido que el impacto de la misma sobre la mortalidad de la población es casi tan importante como el del tabaquismo (Kitahara y cols., 2014; Beltran y cols., 2015).

Es ampliamente conocido que la presencia de obesidad conlleva al establecimiento de un estado pro-inflamatorio crónico de bajo grado a nivel sistémico (Van der Heijden y cols., 2015; Wensveen y cols., 2015). El mecanismo por el cual dicho estado se desarrolla aun no ha sido perfectamente dilucidado; sin embargo, se ha propuesto que el aumento descontrolado del tamaño de la célula adiposa (al exceder su capacidad de almacenamiento de ácidos grasos), el estrés mecánico al que se encuentra

sometida y fenómenos como la hipoxia y la muerte celular, conllevan al montaje y la activación de la respuesta inmune (Reilly y cols., 2017).

Diversos estudios han sugerido que muchas de las comorbilidades favorecidas por la obesidad están relacionadas con este estado pro-inflamatorio crónico de bajo grado, por lo que comprender mejor su fisiopatología es de gran importancia (Divella y cols., 2016; Reilly y cols., 2017).

La obesidad en sí y todas las comorbilidades que favorece, aumentan la mortalidad de manera significativa ya que se ha estimado una reducción de la esperanza de vida de por lo menos 5 años en los sujetos con obesidad (Nagai y cols., 2012; Li y cols., 2014). Por otro lado, se ha considerado que el resultado de los costos anuales de atención a la salud, derivados de la obesidad y de las complicaciones de ésta, representan y sobre todo representarán, costos prohibitivos que crearán crisis financieras en los sistemas de salud en los años futuros (Ryan, 2009; Dee y cols., 2014).

La obesidad se ha asociado con una larga lista de entidades patológicas, como la diabetes mellitus tipo II (DM2), enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de neoplasias (Kyriakoula y cols., 2010; Gallagher y LeRoith, 2015; Wang y cols., 2016). Hay que tener en consideración que la obesidad es una de las causas evitables más importantes asociadas con la aparición de neoplasias en el ser humano (Arnold y cols., 2016; Argolo y cols., 2018).

El Fondo de Investigación Mundial del Cáncer, ha estimado desde hace muchos años, que alrededor del 30-40% de todos los tipos de cáncer se pueden atribuir a una alimentación inadecuada, a la inactividad física y a la presencia de un incremento de peso (World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 2007).

Recientemente, en un trabajo publicado por Da Silva y cols., en 2018, se señala que los tumores malignos de tipo glandular, ~~como lo es el CaM~~, son consecuencia de

alteraciones metabólicas preexistentes, ya que la presencia de un ambiente de estrés metabólico favorece en estas células la capacidad de sobre expresarse, para en esa forma poder combatir la falta de oxígeno, de vascularización y de requerimientos hormonales.

Diversos estudios demuestran que, aunque la mayoría de los individuos en diferentes tipos de sociedades incluida la nuestra, conocen la asociación de la obesidad con algunos tipos de comorbilidades, dichos individuos no conocen que la obesidad puede favorecer el desarrollo de determinadas neoplasias (Soriano y cols., 2012).

En relación con aquellos tipos de cáncer en los cuales se ha postulado que la obesidad influye en su morbilidad y/o mortalidad, el CaM en la mujer posmenopáusica, ocupa un lugar preponderante (Schvartsman y cols., 2017; Gravena y cols., 2018; Zhao y cols., 2018).

2.3. CÁNCER DE MAMA

El CaM, definido por el National Cancer Institute (NCI), como el crecimiento anormal y descontrolado de las células que componen el tejido mamario y que tienen la capacidad de diseminarse (<https://www.cancer.gov>, 2017), constituye un problema de salud pública mundial, al ser el cáncer más común entre las mujeres y la principal causa de muerte por cáncer en las mismas. De acuerdo con los datos del GLOBOCAN 2018, se estimó que existieron ~2.08 millones de nuevos casos, es decir un 24.2% del total de neoplasias diagnosticadas en mujeres a nivel mundial y aproximadamente el 15% (600 mil) del total de muertes relacionadas con cáncer (<https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>).

En México de acuerdo con el último registro publicado en el año 2015, por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la incidencia de CaM en mujeres

mayores de 20 años fue de 28.75 nuevos casos por cada 100,000 habitantes, mientras que la mortalidad fue de 14.35 por cada 100,000 habitantes (<http://inegi.org.mx>, 2015).

De acuerdo con los datos del estudio “Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama” publicado por el INEGI en 2015, al analizarse la incidencia de acuerdo con la edad, existe un incremento en la incidencia de esta patología, hasta antes de los 64 años conforme se incrementa la edad de la mujer, siendo el grupo de edad de 60 a 64 años en el que se concentra la mayor cantidad de casos nuevos (68 nuevos casos por cada 100,000 mujeres de este grupo de edad). La tasa de mortalidad entre las mujeres con CaM también se incrementa conforme a la edad. En 2013, se observa que la tasa más alta se ubica en las mujeres de 80 años y más (63 de cada 100,000 mujeres de este grupo de edad) ([http://inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama, 2015](http://inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama,2015)).

En relación a su etiología, se ha estimado que los alelos de alta penetrancia conocidos como BRCA-1 y BRCA-2, explican alrededor del 18% de los cánceres de mama de tipo hereditario (Lalloo y cols., 2012). Sin embargo, el mayor porcentaje de mujeres con este cáncer, son casos esporádicos y en la actualidad se considera que su etiología es multifactorial, en la cual la exposición a factores de riesgo, como son los factores reproductivos (menarca temprana, menopausia tardía, primer embarazo a una edad avanzada) y el estilo de vida (incluyendo una menor actividad física, el consumo de dietas altas en calorías, etc.), podrían desempeñar un papel crucial en el desarrollo de esta enfermedad (Makama y cols., 2017; Arthur y cols., 2018; Feng y cols., 2018).

2.4. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

El CaM es una patología compleja y heterogénea que comprende múltiples entidades de tumores, los cuales se asocian con patrones histológicos, características biológicas y comportamientos clínicos muy diferentes (Weigelt y cols., 2009). La mayoría de estos tumores son considerados carcinomas, los cuales representan un tipo de tumor que se origina de las células epiteliales que revisten a los órganos y los tejidos (National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov>, 2017).

La mama está compuesta por diferentes tipos celulares y la proliferación no controlada que se presenta en el cáncer, puede afectar a uno o varios de ellos. La clasificación histológica está determinada por el tipo de células que se encuentran afectadas, siendo las principales aquellas que forman los ductos o conductos galactóforos (carcinoma ductal) y los lobulillos o glándulas productoras de la leche (carcinoma lobulillar). Asimismo, la capacidad de propagarse a los tejidos circundantes les confiere la denominación de infiltrantes o invasores. El carcinoma ductal infiltrante de mama es el tipo histológico de CaM más frecuente y representa el 70-80 % de todos los casos a nivel mundial (National Cancer Institute, www.cancer.gov, 2017).

El American Joint Committee on Cancer (AJCC) estableció una estrategia para clasificar a las mujeres con CaM según el pronóstico, ésta se basa en una estadificación de acuerdo con el tamaño del tumor (T), la afectación de ganglios linfáticos (N) y la presencia o ausencia de metástasis (M) (Tabla 1).

Las decisiones terapéuticas se formulan en parte, de acuerdo con las combinaciones resultantes de la clasificación TNM, las cuales se dividen en 5 estadios clínicos (Tabla 2) (AJCC Cancer Staging Manual, 2018).

TABLA 1
SISTEMA DE ESTADIFICACIÓN TNM

<i>Categoría</i>	<i>Criterios</i>
<i>T (tamaño del tumor)</i>	TX El tumor no puede ser determinado T0 No hay evidencia de tumor primario Tis Carcinoma <i>in situ</i> T1 < 2mm T2 > 2mm < 50mm T3 > 50mm T4 Cualquier tamaño con extensión a pared torácica o piel
<i>N (ganglios linfáticos)</i>	NX No pueden determinarse ganglios N0 No hay evidencia de metástasis a ganglios N1 Metástasis de 1-3 ganglios N2 Metástasis de 4-9 ganglios N3 Metástasis de >10 ganglios
<i>M (metástasis)</i>	M0 No hay evidencia clínica ni radiográfica de metástasis M1 Metástasis detectada por medios clínicos o radiográficos

Fuente: American Joint Committee on Cancer • 2018.

TABLA 2
ASIGNACIÓN DE ESTADIO CLÍNICO PARA CÁNCER DE MAMA

T	N	M	Estadio asignado
Tis	N0	M0	0 Tumor <i>in situ</i>
T1	N0	M0	IA
T0	N1	M0	IB
T1	N1	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Cualquier T	N3	M0	IIIC
Cualquier T	Cualquier N	M1	IV El cancer se ha diseminado a otras partes del cuerpo

Fuente: American Joint Committee on Cancer • 2018.

Además de las características clínico patológicas, en el año 2003, la OMS estableció una clasificación molecular intrínseca, basada en la expresión de receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) en las células tumorales (Tavassoli y cols., 2003; Jonas y cols., 2012; www.cancer.gov, 2017).

Los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) son proteínas asociadas al núcleo, las cuales funcionan como factores transcripcionales para la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y la proliferación. Aproximadamente el 75% de los tumores de CaM expresan RE y/o RP (Osborne y Schiff, 2011). El HER2 es una proteína transmembranal con actividad de tirosina-cinasa involucrada en procesos de proliferación, supervivencia celular y fenómenos de invasión y metástasis. Este receptor, se encuentra sobreexpresado en el 25-30% de los tumores de CaM, confiriéndoles el fenotipo de tumor agresivo (González-Niño y cols., 2007).

En la actualidad, se describen 4 subtipos moleculares de CaM (Tabla 3) (Tavassoli y cols., 2003; Jonas y cols., 2012; www.cancer.gov, 2017). La importancia clínica del subtipo molecular radica en su uso como factor pronóstico y predictor de respuesta al tratamiento. El subtipo molecular de CaM luminal A presenta el mejor pronóstico; por el contrario, los subtipos negativos a receptores hormonales (triple negativo y HER2) son más agresivos y tienen mayor propensión a metástasis viscerales (Bagaria y cols., 2014).

TABLA 3
SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA

<i>Subtipo Molecular</i>	<i>Expresión genética</i>	<i>Características</i>
<i>Luminal A</i>	Alta para RE/RP con baja proliferación, HER2-	Prevalencia 40%. Excelente pronóstico, mejor respuesta a terapia hormonal
<i>Luminal B</i>	Baja para RE/RP con alta proliferación, HER2+	Prevalencia 20%. Tumores menos diferenciados, mejor respuesta a quimioterapia
<i>Triple Negativo</i>	RE/RP- y HER2-	Prevalencia 15%. Mayor mortalidad y difícil manejo terapéutico
<i>HER2</i>	HER2+ y RE/RP -	Prevalencia 10%. Susceptible a tratamiento específico contra el receptor HER2

Fuente: American Joint Committee on Cancer • 2018.

2.5. FACTORES DE RIESGO PARA CÁNCER DE MAMA

De acuerdo a la OMS y al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), se han documentado diversos factores de riesgo para el desarrollo de CaM:

- Edad, el riesgo de CaM se incrementa con la edad, observándose la mayor prevalencia en aquellas mujeres mayores de 50 años.
- Historia familiar de CaM, particularmente la que se encuentra asociada a la presencia de mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2 y p53, conlleva un aumento elevado del riesgo de desarrollar esta enfermedad.
- Los factores reproductivos, en los que se encuentra una exposición prolongada a estrógenos endógenos, como son una menarca temprana, una menopausia tardía, así como el primer embarazo a una edad avanzada.
- La administración exógena de estrógenos también genera un aumento en el riesgo para el desarrollo de CaM, habiéndose encontrado que en las usuarias de terapia oral anticonceptiva y de reemplazo hormonal, el riesgo es más elevado.

- Dentro de los factores asociados al estilo de vida, se ha comprobado que el consumo de alcohol y la presencia de obesidad, así como la inactividad física representan un determinante importante para el desarrollo de esta patología (División of Cancer Prevention and Control, CDC, 2017; WHO, 2017).

2.6. OBESIDAD Y CÁNCER DE MAMA EN LA MUJER POSMENOPÁUSICA

El tejido adiposo subcutáneo, constituye la fuente principal de estrógenos en la mujer posmenopáusica; la enzima aromatasa es la responsable de la biosíntesis de estrógenos a partir de los andrógenos precursores que se encuentran en la circulación. La mama está compuesta por diferentes tipos de tejidos, siendo uno de ellos el tejido adiposo subcutáneo (Savolainen y cols., 2014; Gerard y cols., 2018). En las mujeres posmenopáusicas con obesidad, existe una mayor expresión y actividad de la aromatasa en el tejido adiposo de la mama, lo que genera un aumento localizado en la síntesis y concentración de estrógenos 50 a 100 veces mayor que en las mujeres que no presentan obesidad (Engin, 2017).

El papel que desempeña la obesidad en el desarrollo de CaM en la mujer posmenopáusica, así como en su progresión y pronóstico han sido ampliamente documentados (Grossmann y Cleary, 2012; Engin y cols., 2017; Fletcher y cols., 2017). Se ha sugerido que las mujeres posmenopáusicas con obesidad, al momento del diagnóstico de CaM, presentan un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad (Druesne-Pecollo y cols., 2012; Arce-Salinas y cols., 2014; Scholz y cols., 2015; Fontanella y cols., 2015) y de muerte por este cáncer (Chan y cols., 2014; Playdon y cols., 2015; Chan y Norat, 2015).

La presencia de obesidad en mujeres posmenopáusicas incrementa significativamente el riesgo de desarrollar CaM infiltrante como ha sido demostrado por

Neuhouser y cols. (2015). Dichos autores llevaron a cabo el seguimiento de 67,000 mujeres posmenopáusicas durante un periodo de 13 años, encontrándose que la obesidad se asociaba con la presencia de una enfermedad avanzada, la cual incluía tumores de mayor tamaño, afectación de ganglios linfáticos e invasión a otros órganos. La presencia de un IMC igual o superior a 35 kg/m², aumentó el riesgo para el desarrollo de CaM con receptores hormonales positivos, mostrando un cociente de riesgos de 1.58. Dentro de este estudio también se encontró que las mujeres posmenopáusicas de peso normal que aumentaron 5 kg durante el seguimiento del estudio, aumentaron su riesgo de desarrollar CaM con un cociente de riesgos de 1.36.

2.7. AMBIENTE TUMORAL

Se ha demostrado que las células adyacentes al tejido tumoral no solo son estructuras pasivas, sino elementos activos involucrados en la progresión del tumor mismo (Zhao y cols., 2012; Renehan y cols., 2015; Fletcher y cols., 2017). En el CaM, el tejido adiposo mamario desempeña este papel al ejercer influencia sobre las etapas tempranas de la carcinogénesis, la progresión del tumor y la respuesta al tratamiento de los tumores ya establecidos (Wang y cols., 2012; Divella y cols., 2016; Fletcher y cols., 2017). La función del tejido adiposo mamario en el CaM es de gran importancia clínica.

La obesidad induce la expresión alterada de hormonas, factores de crecimiento, citocinas inflamatorias y de proteínas propias del tejido adiposo, denominadas “adipocinas”, que condicionan tanto la supervivencia de las células cancerosas, como la metástasis, la angiogénesis, y la disminución de la apoptosis en estas células (Khan y cols., 2013; Bougaret y cols., 2018). Se ha descrito que las adipocinas desempeñan un factor preponderante en la etiología del CaM en mujeres con obesidad (Cha y cols., 2018; Choi y cols., 2018; Li y cols., 2018). Las dos adipocinas que se han asociado en mayor

grado con el desarrollo de este cáncer son la leptina y la adiponectina (Sultana y cols., 2017; Crean-Tate y cols., 2018; Xi y cols., 2018).

Por otra parte, la actividad física se asocia consistentemente con una disminución en el riesgo de desarrollar cáncer (WHO 2017). El National Cancer Institute (NCI) considera al ejercicio como un factor protector ante el desarrollo de CaM (<https://www.cancer.gov>, 2017). En un meta análisis llevado a cabo por Lahart y cols., en 2015, se evaluaron 123,574 mujeres con CaM, encontrándose una relación inversa entre la actividad física y los eventos secundarios del CaM (recurrencia de CaM o muerte por CaM).

Los beneficios asociados a la actividad física, son mediados por el tejido muscular el cual posee una amplia actividad endócrina, al expresar y secretar proteínas como consecuencia del estímulo originado por la contracción de las fibras musculares; estas proteínas, denominadas “miocinas”, interactúan no sólo de manera local en el músculo, sino también, al ser incorporadas a la circulación sistémica intervienen en los procesos metabólicos de otros tejidos como el tejido adiposo. (Thomas y cols., 2017; Kazeminasab y cols., 2018). En relación con el gran incremento en la prevalencia de obesidad, el ejercicio y los beneficios metabólicos que ejerce, han sido tema de interés científico en los últimos años (Fan y cols., 2017).

Una de las proteínas implicadas en la regulación del metabolismo energético, es la miocina irisina, originalmente descrita como una proteína expresada y secretada por el tejido muscular que actúa a nivel de tejido adiposo (Bostrom y cols., 2012; Vaughan y cols., 2014).

2.8. FNDC5/IRISINA

El gen de la fibronectina tipo III, en el cual se contiene el dominio 5 (FNDC5), se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 1, en la posición 35.1. Dicho gen codifica para la proteína del mismo nombre, la cual es una proteína de membrana de tipo I que posterior a su expresión sufre un corte enzimático, liberándose un polipéptido de 112 aminoácidos denominado irisina (Panati y cols., 2016). La expresión del gen FNDC5 y consecuentemente la liberación y secreción de irisina, tienen lugar principalmente en el tejido muscular y se encuentran aumentadas tras la actividad física al ser estimuladas por el coactivador transcripcional PGC1 α (Bostrom y cols., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que la irisina es expresada por otros tejidos, entre ellos el tejido adiposo, habiendo sido definida también como una adipocina (Huh y cols., 2012; Aydin y cols., 2014). Diversos estudios demuestran que la irisina participa en el mantenimiento de la homeostasis metabólica, al estimular la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo, así como en la modulación de factores de inflamación (Mazur y cols., 2017; Nie y cols., 2017; Kazeminasab y cols., 2018).

En el tejido adiposo, se ha propuesto que la irisina induce el proceso de termogénesis a través del incremento en la expresión de la proteína desacoplante 1 (UPC1) (Zhang y cols., 2016; Ruiz y cols., 2018). La termogénesis es definida como la generación de calor a partir de la utilización de glucosa y ácidos grasos por parte del tejido adiposo, aumentándose el gasto energético total y contribuyendo no solo a la reducción del peso corporal, sino también a la reducción de la concentración de glucosa en sangre (Fenzl y cols., 2014).

Existe controversia respecto a los niveles séricos de irisina y su asociación con el IMC. Diversos estudios señalan la existencia de una relación positiva (Huh y cols., 2012;

Stengel y cols., 2013; Crujeiras y cols., 2015), mientras que otros mencionan la existencia de una relación negativa (Moreno-Navarrete y cols., 2013; Fenz y cols., 2014).

2.9. IRISINA EN CÁNCER DE MAMA

Son pocos los estudios hasta ahora realizados en cuanto a la función que la proteína irisina desempeña en el CaM. Un estudio *in vitro* llevado a cabo por Gannon y cols. (2015) demostró que una mayor concentración de irisina disminuye en forma significativa el número de células epiteliales mamarias malignas, su migración y su viabilidad al compararse con células no malignas. Más aún, esta proteína incrementó el efecto citotóxico de la doxorubicina en las células malignas, hecho no observado en aquellas células carentes de malignidad. Asimismo, Provatopoulou y cols. (2015), demostraron que las concentraciones plasmáticas de irisina se encuentran disminuidas en pacientes con CaM, comparándose con controles, se estimó que el incremento de una unidad en las concentraciones de irisina reduce la probabilidad de CaM en alrededor de un 90%.

Kuloglu y cols. (2016), desarrollaron un estudio en donde analizaron, mediante inmunohistoquímica, el patrón de expresión de la irisina en diversos tipos de cáncer incluyendo el CaM. Se demostró que esta proteína se expresa en forma significativa en todas las muestras de tejido tumoral de mama (lobular invasivo, papilar intraductal, ductal invasivo, papilar invasivo y carcinomas mucinosos), en comparación con el tejido mamario sano. Es importante señalar, que los autores analizaron como un mismo grupo tanto a mujeres premenopáusicas como a mujeres posmenopáusicas, no estratificándose a las mujeres de acuerdo con su IMC.

Por lo anterior, el estudio de la irisina en una población determinada y en la cual el CaM tiene un gran impacto, como son las mujeres posmenopáusicas, permitirá una

mejor comprensión de la participación de esta adipomiocina en una de las principales patologías asociadas a la obesidad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, la prevalencia de obesidad en la población adulta se ha incrementado durante las últimas décadas; las mujeres son el principal grupo afectado por esta entidad patológica (ENSANUT, 2016). En la posmenopausia, la presencia de obesidad conlleva una mayor frecuencia en el desarrollo de CaM, aunado a un mayor riesgo en la recurrencia de este cáncer, así como en la mortalidad por el mismo (Neuhouser y cols., 2015).

Dentro de los mecanismos propuestos para explicar la asociación de la obesidad con el desarrollo de CaM, se encuentra la expresión alterada de proteínas derivadas del tejido adiposo, las cuales promueven el desarrollo de un ambiente proinflamatorio y proliferativo y que además, poseen la capacidad de interactuar con el tejido tumoral (Engin y cols., 2017). Por otro lado, se ha propuesto que proteínas como la irisina, la cual es expresada por el tejido adiposo, participa en procesos antiinflamatorios, incrementa la sensibilidad a insulina y produce un aumento de las enzimas antioxidantes (Askari y cols., 2018).

Sin embargo, en la actualidad, se desconoce si las células tumorales son capaces de expresar a la irisina por sí solas o si dicha expresión es resultado del aporte de los tejidos circundantes al tumor y si factores como las diferencias en el IMC definen el patrón de su expresión en determinadas patologías.

4. OBJETIVOS

Comparar la expresión de la irisina en el tejido tumoral mamario de mujeres posmenopáusicas, con diagnóstico de CaM infiltrante no hereditario, que presentan diferentes índices de masa corporal.

Determinar la expresión de la irisina *in vitro*, empleando las líneas celulares pertenecientes a CaM con subtipo molecular: luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo.

5. HIPÓTESIS

Las mujeres posmenopáusicas con diagnóstico de CaM infiltrante presentarán diferentes perfiles de expresión de la irisina en el tejido tumoral mamario, los cuales se relacionarán con los diferentes índices de masa corporal.

Las líneas celulares, correspondientes a los subtipos moleculares de CaM: luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo, tendrán la capacidad de expresar a la irisina con un perfil de expresión diferente entre cada línea.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional de casos y controles, transversal y analítico.

6.2. SUJETOS

Se incluyó una población total de 105 mujeres posmenopáusicas con diagnóstico histológico de CaM infiltrante, pertenecientes al Instituto de Enfermedades de la Mama, FUCAM A.C.

Criterios de inclusión:

1. Mujeres posmenopáusicas mayores de 45 años de edad y con al menos un año de amenorrea.
2. Diagnóstico histopatológico de CaM infiltrante operable.

Criterios de exclusión:

1. Mujeres con CaM que hayan recibido previamente tratamiento con quimioterapia, hormonoterapia y/o radioterapia.
2. Antecedente familiar de CaM.
3. Antecedente de cualquier otro tipo de neoplasia.
4. Mujeres histerectomizadas menores de 55 años.
5. Procesos patológicos que condicionasen la obesidad como una enfermedad secundaria: i.e. Síndrome de Prader Willi, Síndrome de Lawrence Moon, Síndrome de Cushing, etc.

Criterios de eliminación:

1. Que deseen retirar su muestra del estudio.
2. Que el tejido no cuente con la calidad para llevar a cabo el análisis inmunohistoquímico.

De todas las mujeres participantes, fueron solicitados y concentrados los siguientes datos:

- Edad al momento del diagnóstico de CaM
- Peso y talla al momento del diagnóstico de CaM
- Antecedente de alcoholismo y/o tabaquismo
- Edad de menarca y de menopausia
- Número de embarazos, partos, cesáreas y/o abortos
- Método empleado de planificación familiar
- Antecedente de histerectomía
- Tratamiento de reemplazo hormonal
- Comorbilidades y tratamientos actuales

De igual forma, se recopiló el reporte histopatológico de los tumores, en el cual se incluyó:

1. Tamaño del tumor
2. Estadio ganglionar
3. Estadio clínico asignado
4. Perfil inmunohistoquímico: estado del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2); así como el estado de receptores hormonales (RE/RP)

Todas las mujeres fueron clasificadas en 3 grupos de acuerdo con su IMC (el cual fue determinado al momento del diagnóstico de CaM):

- Peso normal (IMC = 20-24.9 kg/m²)
- Sobrepeso (IMC = 25.0–29.9 kg/m²)
- Obesidad (IMC \geq 30 kg/m²)

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

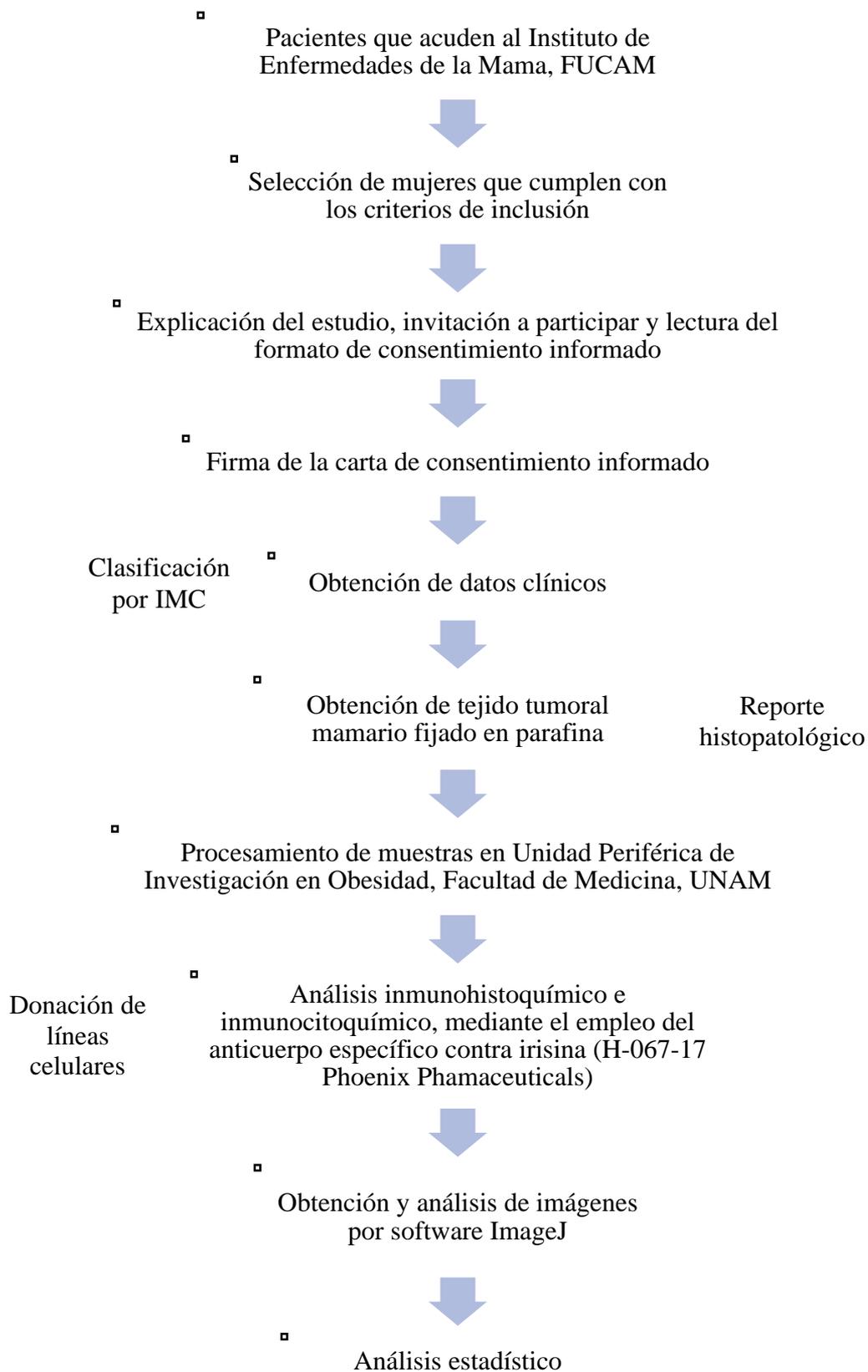
Los procedimientos propuestos en este protocolo tienen su fundamento en las normas éticas vigentes en nuestro país, en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y en la Declaración de Helsinki.

Para la realización de este estudio, se obtuvo la aprobación de las Comisiones de Investigación y Ética del Instituto de Enfermedades de la Mama, FUCAM y de la División de Investigación de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se invitó a participar a mujeres que cumplieren con los criterios de inclusión, explicándoseles detalladamente el propósito y el fin del estudio. Las mujeres que aceptaron participar leyeron en su totalidad el formato de consentimiento informado y posteriormente, si estaban de acuerdo, firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

Los datos derivados de este proyecto han sido almacenados bajo llave en un archivero exclusivo para los mismos, el cual es manejado solamente por los investigadores responsables.

8. DIAGRAMA METODOLÓGICO



9. MÉTODOS

9.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

De cada una de las mujeres participantes, se obtuvo una muestra de tejido tumoral mamario fijado en parafina; la cual se recolectó tras la resección quirúrgica del tumor, en el Instituto de Enfermedades de la Mama (FUCAM). La fase experimental del estudio se llevó a cabo en la Unidad Periférica de Investigación en Obesidad, perteneciente a la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Dicha Unidad se encuentra ubicada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

9.2. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Para llevar a cabo el análisis de expresión de la irisina, al tejido tumoral mamario fijado en parafina se le realizaron cortes de 5µm de grosor, mediante el empleo de un micrótopo. Dichos cortes fueron colocados en laminillas precargadas con poli-lisina (Kling-On HIER Slides, BioCare Medical, E.U.).

Las laminillas con el tejido de interés, se desparafinizaron empleándose calor seco (60°C) por 20 minutos. Se procedió a completar la desparafinización e hidratación de los tejidos, sometiéndolos a xilol y alcohol a diferentes porcentajes por 5 minutos cada uno. A continuación, se llevó a cabo el proceso de desenmascaramiento de antígenos; para ello, las laminillas con los tejidos fueron colocadas en un amortiguador de citratos (20X Immuno/DNA Retriever with citrate, BioSB, CA, E.U.) y sometidas a calor por 20 minutos. Se procedió con el bloqueo de la peroxidasa endógena, utilizándose una solución de peróxido de hidrógeno al 9%, por un tiempo de 35 minutos, seguido del bloqueo de uniones inespecíficas (ImmunoDNA background blocker, BioSB, CA, E.U.) por 20 minutos. Se realizó la incubación con el anticuerpo específico contra irisina (Irisin 42-

112, Phoenix Pharmaceuticals, CA, E.U.), a una dilución de 1:600 por 2hrs (Anexo 2). Con el fin de demostrar la presencia del antígeno (proteína irisina) en el tejido, se hizo uso del sistema universal de detección secundario, basado en la utilización de inmunoglobina anti-conejo biotinilada y estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (Mouse/Rabbit Immunodetector Label, BioSB, CA, E.U.), incubándose cada reactivo por 20 minutos. El revelado de los antígenos se llevó a cabo mediante el empleo de diaminobencidina (DAB) (PolyDetector DAB, Brown Substrate Chromogen, BioSB, CA, E.U.) que, al interactuar con la peroxidasa de rábano, genera un producto que forma una señal visible color marrón, indicando el lugar de localización de nuestra proteína de interés.

Entre cada paso de la técnica, se realizaron lavados de las laminillas con amortiguador de fosfatos a pH de 7.0, evitando dañar el tejido. Todas las laminillas fueron contra teñidas con hematoxilina. Una vez completada la tinción, las muestras fueron deshidratadas y fijadas con resina para su adecuada conservación y almacenamiento.

Como control positivo y para la normalización del protocolo, la expresión de la proteína en estudio también se analizó en tejido muscular sano (Anexo 3). Como control negativo se omitió un paso importante de la técnica, el cual fue la incorporación del anticuerpo contra irisina.

9.3. OBTENCIÓN DE IMÁGENES

De cada una de las laminillas fueron obtenidas 10 fotografías de áreas representativas del tumor . Para ello se empleó un microscopio de campo claro (Olympus) adaptado a una cámara digital y con un objetivo de 20X. Las fotografías fueron guardadas en formato TIF para su análisis posterior, manteniéndose las condiciones de luz y contraste iguales para todas las muestras.

9.4 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO POR SOFTWARE

Para llevar a cabo el análisis cualitativo de la expresión proteica por inmunohistoquímica se empleó el método de H-Score (Varghese y cols., 2014), determinado a través del software IHC Profiler de ImageJ, el cual puede ser descargado de la dirección electrónica: <https://imagej.net>.

El análisis se inició con la incorporación de una fotografía del tumor en formato TIF al software ImageJ, posteriormente se seleccionó el comando IHC Profiler del menú, especificando que la proteína de interés posee una localización citoplasmática y que para la tinción del tejido se empleó DAB y hematoxilina. El software, a través de la deconvolución de los colores pertenecientes al espectro de DAB y de hematoxilina, generó 3 imágenes a partir de la misma fotografía, una correspondiente al espectro de color para DAB, otra para el espectro de hematoxilina y la tercera como una imagen residual. A partir de la imagen de DAB, se contabilizó el número total de píxeles en la fotografía y se determinó el porcentaje de los mismos correspondiente a cada una de las zonas de intensidad de color (Anexo 4). Finalmente, para obtener el H-Score se utilizó la fórmula algebraica $H\text{-Score} = (\text{número de píxeles en una zona} \times \text{valor de la zona}) / (\text{número total de píxeles})$. El resultado de la fórmula determina el valor de la expresión de la proteína en el tejido: 0+ (negativo), 1+ (débil positivo), 2+ (positivo) y 3+ (alto positivo).

El proceso anteriormente descrito, fue realizado individualmente para cada una de las 10 fotografías por muestra, el H-Score de cada muestra fue el resultado del promedio de las 10 áreas representativas del tumor.

9.5. LÍNEAS CELULARES

Se llevó a cabo el análisis *in vitro*, con la finalidad de evaluar cualitativamente la expresión de esta proteína por la célula tumoral, sin que existiese interacción o influencia del microambiente que rodea a este tipo de células en los tejidos *in vivo*. Para ello, fueron utilizadas las líneas celulares correspondientes a los subtipos moleculares de CaM: luminal A (MCF-7), luminal B (BTB-474), HER2 (SKBR-3) y triple negativo (MDA-MB-231). Dentro de este grupo se utilizó como muestra control a la línea celular MCF-10A, derivada de una enfermedad mamaria benigna (mastopatía fibroquística) (Tabla 4).

TABLA 4
CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES

<i>LÍNEA</i>	<i>ENFERMEDAD</i>	<i>CARACTERÍSTICAS</i>
MCF 10A*	Mastopatía Fibroquística	Organismo: Homo sapiens Tejido: Glándula mamaria Tipo Celular: Epitelial
MCF 7	CaM Luminal A	Organismo: Homo sapiens Tejido: Derrame pleural Tipo Celular: Epitelial
BT 474	CaM Luminal B	Organismo: Homo sapiens Tejido: Glándula mamaria Tipo Celular: Epitelial
SKBR 3	CaM HER2	Organismo: Homo sapiens Tejido: Derrame pleural Tipo Celular: Epitelial
MDA MB 231	CaM Triple Negativo	Organismo: Homo sapiens Tejido: Derrame pleural Tipo Celular: Epitelial

*Línea celular no tumorigénica

Fuente: <https://www.atcc.org>

9.6 CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares fueron donadas por la Unidad de Bioquímica “Dr. Guillermo Soberón Acevedo” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Mediante una técnica aséptica se colocó cada línea celular en una caja estéril de 100mm de diámetro, con el medio de crecimiento correspondiente. Para la línea MCF-10A se utilizó el medio Delbucco’s Modification of Eagle’s Medium (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, E.U.) enriquecido y adicionado con glutamina 2mM, hidrocortisona 1ug/mL, insulina 0.5U/mL y factor de crecimiento epidérmico (EGF) 20ng/mL. Para la línea MFC-7 se utilizó el medio DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, E.U.) y para las líneas BT-474, SKBR-3 y MDA-MB-23 se utilizó el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, E.U.). Todos los medios de crecimiento incluyeron 10% de suero fetal bovino (SFB) y se mantuvieron a un pH de 7. El proceso de cultivo celular se realizó en una campana de flujo laminar y posteriormente las células se mantuvieron en una incubadora bajo las condiciones de temperatura de 37°C y atmósfera con CO₂ al 5%.

Se mantuvo un seguimiento de las características de las células, utilizándose un microscopio de campo claro invertido (Nikon Elipse TS100), con el fin de detectar tempranamente contaminaciones (bacterias, hongos, levaduras) o cambios espontáneos en el fenotipo de las células. Las células se mantuvieron por debajo del 80% de confluencia, haciendo subdivisiones 2 o 3 veces por semana y llevándose a cabo cambios de medio de crecimiento, así como lavados con buffer de fosfatos.

9.7. CULTIVO EN LAMINILLA

Con el fin de realizar marcaje por inmunocitoquímica, las líneas celulares fueron transferidas a una laminilla para cultivo (Falcon Chambered Cell Culture Slides, E.U.). El proceso se inició con el desprendimiento de las células de las cajas de cultivo, utilizando tripsina al 0.05% por 5 minutos. Posteriormente, se contabilizó el número de células obtenidas, mediante el empleo de una cámara de Neubauer, realizándose un sembrado de aproximadamente 20-30 mil células por cm² en la laminilla, dependiendo de la tasa de crecimiento particular de cada línea celular. Las laminillas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y atmósfera antes mencionadas, con el medio de crecimiento correspondiente para cada una de ellas y realizándose el seguimiento, cambio de medio y lavado, hasta alcanzar una confluencia del 80%. Una vez alcanzada la confluencia se aspiró el medio de cultivo y se procedió a la fijación de las células, empleándose metanol por 5-10 minutos y dejándose secar completamente.

9.8. ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO

La técnica de inmunocitoquímica se realizó utilizándose el anticuerpo contra irisina (Irisin 42-112, Phoenix Pharmaceuticals, CA, E.U.) a una dilución de 1:800. Esta técnica es similar a la descrita anteriormente para los tejidos, omitiéndose el proceso de desparafinización y desenmascaramiento antigénico. Asimismo, para el análisis de la expresión se empleó el software IHC Profiler de ImageJ y el método de H-Score.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el cálculo del tamaño de la muestra nos basamos en el único estudio publicado hasta el momento, en relación a la expresión de irisina en CaM (Kuloglu y cols., 2016), tomándose en consideración un nivel de confianza o seguridad del 95% igual a 1.96, con un poder del 80%, con una diferencia media esperada en la expresión de irisina entre el grupo de mujeres con un IMC clasificado como sobrepeso u obesidad igual a 0.23 y una desviación estándar de 0.49. Con base en esos datos, se obtuvo una $n= 34$ mujeres por grupo de IMC.

Se calcularon frecuencias relativas, medidas de tendencia central y de dispersión para las diversas variables. Las comparaciones entre variables numéricas continuas se analizaron mediante la prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis, de acuerdo con su distribución.

Las relaciones entre las variables cualitativas, como son la expresión de los receptores hormonales y el HER2, así como las características clínico-patológicas de las mujeres con CaM (factores de riesgo para CaM, presencia de DM2, uso de metformina), se determinaron mediante la prueba X^2 .

El análisis de la expresión de la irisina entre los diferentes grupos de estudio fue determinado mediante la prueba X^2 y al encontrarse un resultado significativo ($p > 0.05$), se empleó el análisis de residuos ajustados de Haberman para clarificar la asociación de las variables.

Se utilizó el paquete estadístico XLSTAT (<https://www.xlstat.com/es/>).

11. RESULTADOS

El presente estudio incorporó 105 mujeres posmenopáusicas con diagnóstico de CaM infiltrante, 35 de ellas clasificadas con un IMC normal, 35 con sobrepeso y 35 con obesidad.

En la Tabla 5, se muestran los datos clínicos de nuestra población de estudio, los cuales corresponden a factores de riesgo para CaM, con excepción del uso de metformina que representa un factor protector (Villianou y cols., 2013). Las características histopatológicas de los tumores de cada una de las mujeres se presentan en la Tabla 6. Con el fin de determinar si existe diferencias significativas de las variables entre los grupos de estudio, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para las variables cuantitativas, así como X^2 para las cualitativas.

TABLA 5
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS MUJERES CON CAM

	<i>Peso normal</i> N(35)	<i>Sobrepeso</i> N(35)	<i>Obesidad</i> N(35)	<i>P</i>
IMC (kg/m ²)	23.2 (19.4-24.9)	29.8 (25-29.8)	45.2 (30.2-45.2)	
Edad (años)	60.4 (46-89)	58.1 (45-73)	61.5 (46-79)	0.3262
Menarca (años)	13.2 (10-16) *	12.5 (9-18)	12.4 (10-16)	0.0145
Menopausia (años)	48.8 (40-64)	47 (37-60)	47 (35-55)	0.2687
Paridad (núm. de hijos)	3.2 (0-11)	3.1 (0-13)	4 (0-9)	0.1029
	(%) pacientes	(%) pacientes	(%) pacientes	
Uso de anticonceptivos	48.5	51.4	40	0.6081
TRH	5.7	2.8	5.7	1.0000
Alcoholismo	2.8	5.7	2.8	0.7711
Tabaquismo	8.5	25.7	11.4	0.1017
Diabetes	17.1	17.1	34.2	0.1431
Metformina	11.4	11.4	34.2 *	0.0228

Datos expresados en media y entre () máximos y mínimos.

*p significativa por prueba de Kruskal-Wallis para la variable cuantitativa y X^2 para la variable cualitativa.
n total= 105 pacientes.

TABLA 6
CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE LOS TUMORES

	<i>Peso normal</i> N(35)	<i>Sobrepeso</i> N(35)	<i>Obesidad</i> N(35)	<i>P</i>
Estirpe (%)				
Ductal Infiltrante	88.6	85.7	88.6	0.6951
Lobulillar Infiltrante	8.6	8.6	11.4	
Otro	2.8	5.7	0	
Tamaño tumoral (%)				
<2cm	54.3	40	45.7	0.4723
>2cm	45.7	60	54.3	
Estadio (%)				
I	31.4	28.6	28.6	0.9498
II	60	57.1	57.1	
III	8.6	14.3	14.3	
R. Estrógeno (%)				
Positivo	85.7 *	100	100	0.0052
Negativo	14.3	0	0	
R. Progesterona (%)				
Positivo	71.4 *	91.4	91.4	0.0314
Negativo	28.6	8.6	8.6	
HER2 (%)				
Positivo	14.3	5.7	8.6	0.4154
Negativo	85.7	94.3	91.4	
Subtipo Molecular (%)				
Luminal A	80	97.1	88.6	0.1863
Luminal B	5.7	2.9	8.6	
HER2	2.9	0	0	
Triple negativo	11.4	0	2.8	

Datos expresados en porcentaje.

*p significativa por prueba de X^2 para las variables cualitativas.

n total= 105 pacientes.

Se encontró que las variables: edad de la menarca, uso de metformina y presencia de receptores hormonales, tuvieron una diferencia significativa entre los grupos de estudio. Con base en lo anterior, se realizó una prueba de X^2 para resolver si dichas variables determinaban la expresión de la irisina, sin embargo no fue encontrada diferencia significativa (p= 0.9918).

11.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA IRISINA EN TEJIDO TUMORAL MAMARIO

Se procesaron y analizaron un total de 105 muestras de tejido tumoral mamario fijado en parafina (Figura 1). En la Tabla 7, se presentan los resultados de H-Score emitidos por el software IHC Profiler de ImageJ y se muestra el porcentaje de mujeres de cada grupo de IMC correspondiente para cada valor de H-Score.

Se encontró que existe una diferencia significativa ($p= 0.0273$) en las mujeres con CaM y un IMC de obesidad, indicando que este grupo presentan de forma predominante una expresión positiva para la irisina en su tejido tumoral mamario. Asimismo, se observa que en las mujeres con CaM y un IMC normal o de sobrepeso, se encuentra mayor homogeneidad entre los resultados del H-Score; no siendo así para el grupo de mujeres con un IMC de obesidad, en donde se demuestra un aumento en el porcentaje de mujeres conforme aumenta el valor de H-Score.

Figura 1 Expresión de la irisina en tejido tumoral mamario

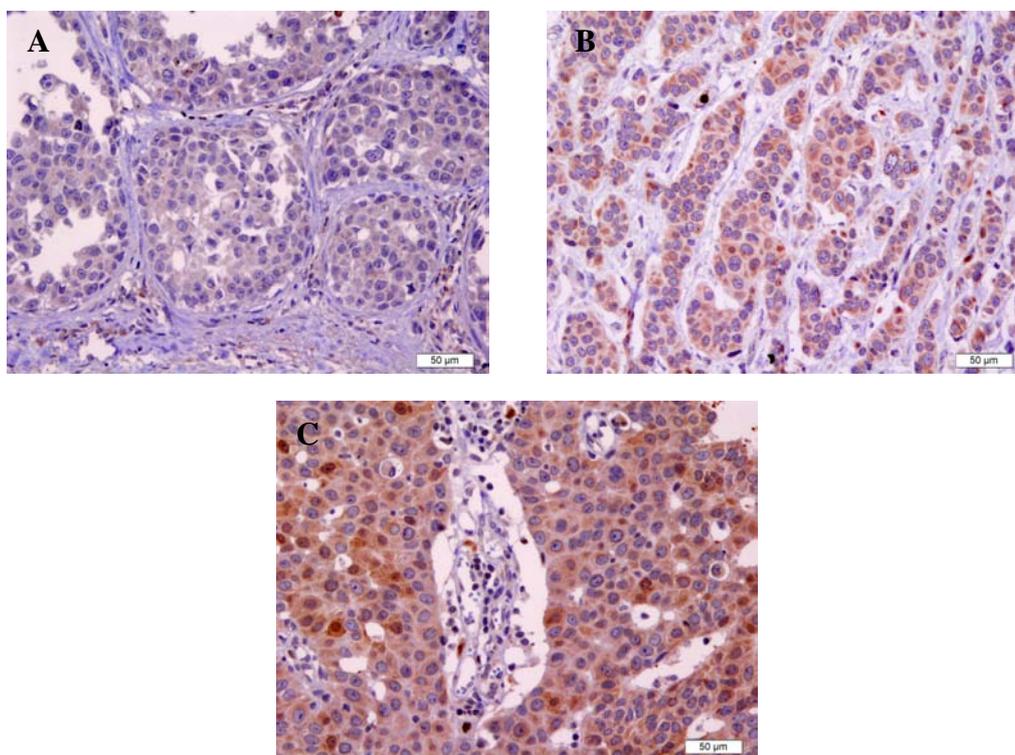


Figura 1: Imágenes tomadas con microscopio de campo claro. Coloración rojo-café indica marcaje del anticuerpo. A: tejido tumoral mamario con marcaje negativo para irisina. B: tejido tumoral mamario con marcaje débil positivo para irisina. C: tejido tumoral mamario con marcaje positivo para irisina

TABLA 7
H-SCORE PARA LA EXPRESIÓN DE LA IRISINA EN EL TEJIDO
TUMORAL MAMARIO

	<i>Negativo</i> (0+)	<i>Débil positivo</i> (1+)	<i>Positivo</i> (2+)	<i>p</i>
Peso normal n=35	34.3	34.3	31.4	0.0273
Sobrepeso n=35	22.8	51.5	25.7	
Obesidad n=35	5.7 *	45.7	48.6	

Datos expresados en porcentaje.

*p significativa por análisis de X², ajustada por la prueba de residuos de Haberman.

n total= 105 pacientes.

11.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE IRISINA EN LÍNEAS CELULARES

El estudio *in vitro* se llevó a cabo empleándose las líneas celulares correspondientes a los diferentes subtipos moleculares de CaM (Figura 2).

Las líneas celulares mostraron el crecimiento morfológico característico de cada una de ellas y el marcaje inmunocitoquímico se observó a nivel citoplasmático. Mediante el uso del software IHC Profiler de ImageJ, se determinó el H-Score de cada línea celular (Tabla 8).

Todas las líneas celulares de CaM presentaron un marcaje positivo para la expresión de la irisina; sin embargo, la intensidad de dicho marcaje varió entre cada una de ellas, obteniendo la línea BT-474, correspondiente a un tipo de CaM con subtipo molecular luminal B, la intensidad más alta en el marcaje de esta proteína

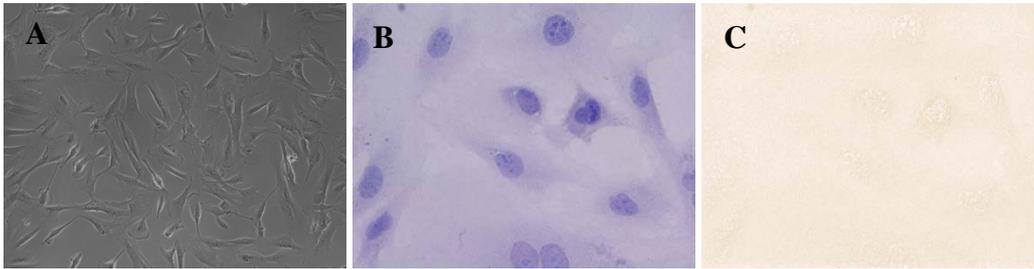
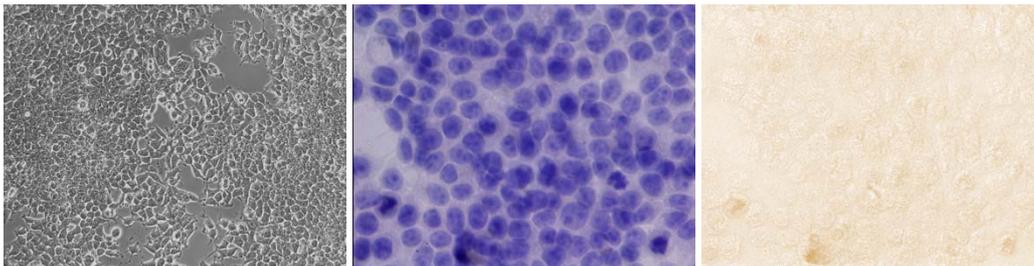
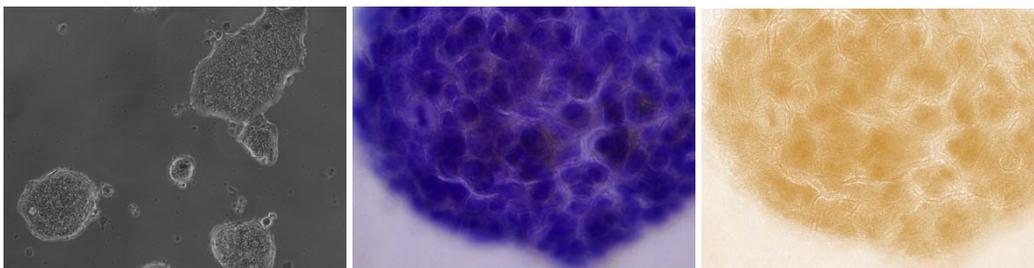
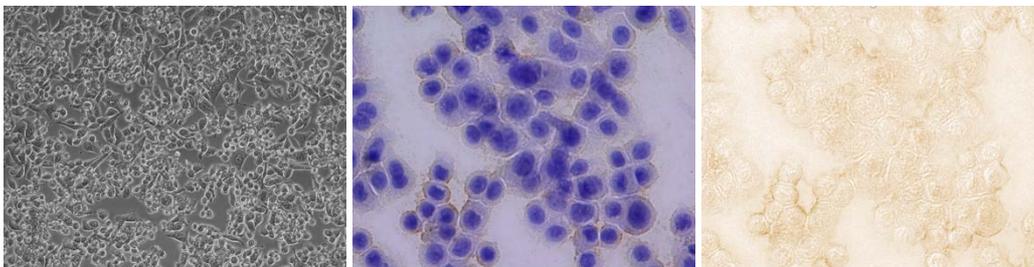
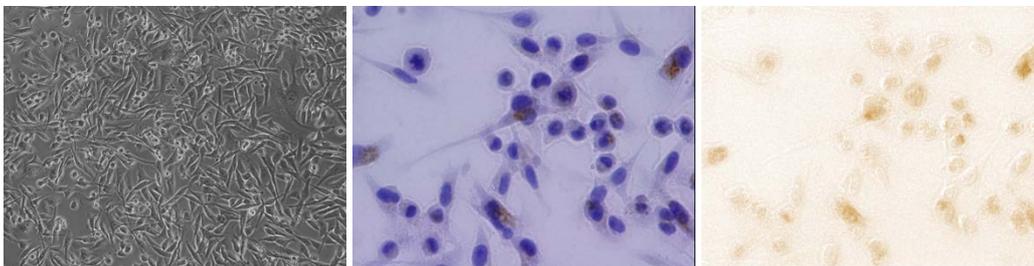
Figura 2 Expresión de la irisina en líneas celulares de CaM**Línea MCF-10A****Línea MCF-7****Línea BT-474****Línea SKBR-3****Línea MDA-MB-231**

Figura 2: Imágenes tomadas con microscopio de campo claro. Coloración rojo-café indica marcaje del anticuerpo. Columna A: crecimiento celular (100µm). B: inmunocitoquímica (20µm). C: análisis de intensidad de marcaje por deconvolución (20µm).

TABLA 8
H-SCORE PARA LA EXPRESIÓN DE LA IRISINA EN CULTIVO CELULAR

	<i>H-Score</i>	
MCF1-0A	1+	Débil positivo
MCF-7	2+	Positivo
BT-474	3+	Alto Positivo
SKBR-3	2+	Positivo
MDA-MB-231	1+	Débil positivo

12. DISCUSIÓN

Es ampliamente conocido que el aumento desproporcionado de peso conlleva al desarrollo de entidades patológicas, entre las que destacan las neoplasias malignas (World Cancer Research Fund International, 2017; Dhalwani y cols., 2018; Namazi y cols., 2018; Ulaganathan y cols., 2018). Es importante señalar que en nuestro país, la prevalencia más alta de obesidad, se encuentra en el grupo de mujeres de 50 a 59 años y que dentro de ésta misma población, el CaM es la principal causa de muerte por neoplasia (ENSANUT 2012; INEGI, 2016).

Es en la posmenopausia cuando la obesidad desempeña un papel importante como factor de riesgo para el desarrollo de CaM (Engin y cols., 2017; American Cancer Society, 2018; Chlebowski y cols., 2018). En las mujeres posmenopáusicas con obesidad se presenta un desequilibrio en la expresión y secreción de diversas adipocinas por parte del tejido adiposo, lo que promueve el establecimiento de un estado proinflamatorio crónico y de estrés oxidativo; ambos fenómenos implicados en la carcinogénesis (Divella y cols., 2016; Agnoli y cols., 2017; Blucher y cols., 2017). Una vez establecido el tumor, el tejido adiposo adyacente a la mama, mantiene una comunicación con la célula tumoral, ayudando al mantenimiento y desarrollo de la misma (Chamberlin y cols., 2017; Nickel y cols., 2017).

Se ha observado que las mujeres posmenopáusicas con obesidad tienen un peor pronóstico en cuanto a sobrevida libre de enfermedad y recurrencia de este cáncer, en comparación con las mujeres posmenopáusicas de peso normal (Gravena y cols., 2018; Sun y cols., 2018). Es por ello, que el desarrollar estudios sobre la relación subyacente entre estas dos patologías (obesidad y CaM en la mujer posmenopáusica), permite comprender mejor los mecanismos por los cuales, el aumento en la adiposidad influye en el desarrollo y pronóstico de esta enfermedad.

La irisina, al ser una adipocina descrita y estudiada en el contexto de gasto energético y metabolismo, ha demostrado ejercer efectos antiinflamatorios al reducir las concentraciones de interleucina 6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática (Park y cols., 2015). Además, presenta efectos antioxidativos, al aumentar la expresión de enzimas antioxidantes como la súper óxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX) en un modelo animal de DM2 (Zhu y cols., 2015).

En cuanto a la inflamación se refiere, Mazur-Bialy en 2017, evaluó la influencia que la administración de irisina exógena tiene sobre la actividad de los macrófagos empleando para ello la línea celular RAW 264.7, demostrando que la irisina regula la actividad de estas células al reducir la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs), lo que sugiere un efecto antiinflamatorio. Por otro lado, Mazur y cols., en 2017, evaluaron de igual forma los efectos que la administración exógena de irisina tiene sobre la inflamación inducida por lipopolisacárido (LPS) en la línea celular 3T3 L1 de adipocitos, concluyéndose que el aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL6, leptina) inducido por el LPS fue contrarrestado por la irisina.

Actualmente, son pocos los estudios de CaM e irisina, en ellos se ha concluido que a nivel sérico, la irisina presenta una menor concentración en mujeres que padecen CaM, en relación a mujeres sanas (Provatopoulou y cols., 2015) y a nivel tisular se ha observado que la irisina es expresada por los diferentes tipos histológicos de CaM (Kuloglu y cols., 2016). En un estudio llevado a cabo con cultivos celulares, la administración exógena de irisina se asoció con una menor proliferación y migración de las células cancerosas (Gannon y cols., 2015). Sin embargo, estos estudios no han sido del todo concluyentes en cuanto a la relación de irisina y CaM, además de que en ninguno

de ellos se delimitó a nuestra población de interés, que es la mujer posmenopáusica y la presencia o ausencia de obesidad en ella.

Es por ello, que en el presente estudio evaluamos la expresión de la irisina en el tejido tumoral mamario de mujeres posmenopáusicas con diagnóstico de CaM infiltrante no hereditario, de acuerdo con su IMC. Nuestros resultados mostraron, que la expresión de la irisina fue significativamente mayor en el tejido tumoral mamario de mujeres con obesidad ($p= 0.0273$), en relación con las que presentan peso normal o sobrepeso. El aumento de la irisina en mujeres con CaM y obesidad, ha sido recientemente descrito por Zhang y cols. (2018) en una cohorte de 148 mujeres mayores de 50 años; a diferencia de nuestro estudio, dicho incremento fue determinado a nivel sérico y se relacionó con la ausencia de metástasis espinal en dicha población. Se ha señalado, que los niveles séricos de irisina son el resultado de la síntesis y secreción de esta proteína por los diferentes depósitos de tejido adiposo, así como por el tejido muscular (Varela y cols., 2016); es por ello, que en patologías como el CaM, el estudio de su expresión a nivel local aporta información más precisa sobre su papel en el desarrollo y progresión de la neoplasia. A nivel de tejido tumoral, la sobreexpresión de la irisina ha sido documentada en cáncer gastrointestinal y hepatocarcinoma (Aydin y cols., 2014; Gaggini y cols., 2017). Es relevante señalar que, para el caso de hepatocarcinoma, el estudio de Gaggini y cols. (2017) evaluó a sujetos con un IMC superior a 30 kg/m^2 y la sobreexpresión de la irisina en el tejido tumoral, se acompañó de un incremento en la expresión de los factores de inflamación $\text{TNF}\alpha$ e IL6 en estos individuos. Lo anterior, propone que el aumento en la expresión de la irisina a nivel local podría encontrarse desempeñando un papel protector ante el estímulo proinflamatorio de la obesidad, en ciertas patologías como el hepatocarcinoma y el CaM (Ma y cols., 2017).

Por otra parte, Zugel y cols. (2016) mediante el empleo de un modelo animal de ratas hembra, evaluaron el efecto que la gonadectomía presenta sobre la expresión de la irisina. En dicho estudio, se simuló la disminución de las hormonas sexuales relacionada con la edad durante la menopausia, y se confirmó que tras la ovariectomía aumentó el peso corporal y el contenido de grasa en estos animales. En dicho trabajo, se demostró que los niveles séricos de irisina fueron mayores en las ratas ovariectomizadas al compararse con las controles, sugiriéndose que el aumento en la adiposidad, secundario a la disminución de hormonas sexuales, estimula asimismo la elevación de la irisina sérica. Posteriormente, tras ser evaluados los secretomas de los diferentes depósitos de grasa en el animal, se encontró que fue el tejido adiposo subcutáneo, el que expresó de forma mayor a la proteína.

Con base en estos antecedentes, se podría inferir que el aumento observado en la expresión de la irisina en el tejido tumoral mamario de mujeres posmenopáusicas, es mayor en aquellas que presentan obesidad ya que el tejido adiposo subcutáneo de la mama en estas mujeres, ejerce un efecto parácrino o un estímulo para la expresión de la irisina por el tumor mismo, el cual podría encontrarse desempeñando un efecto compensatorio ante el estado proinflamatorio característico en la asociación de obesidad y CaM. Nuestro estudio, es el primero en demostrar el incremento local de la expresión de la irisina en el tejido tumoral de CaM, en una población determinada, que es la mujer posmenopáusica y la asociación de obesidad en ella.

En cuanto a la presencia de comorbilidades de la obesidad, en el estudio realizado por El-Lebedy y cols. (2017), se demostró que en sujetos con DM2, las concentraciones séricas de irisina son menores en comparación con sujetos no diabéticos; asimismo, esta menor expresión de la irisina se asoció con un mayor riesgo de daño cardiovascular en los sujetos diabéticos. La relación inversa entre la expresión de la irisina y la presencia

de DM2 ha sido ya ampliamente documentada (Duran y cols., 2015; Zhu y cols., 2015; Panati y cols., 2016; El-Lebedy y cols., 2017). Contrario a esto, en nuestra población de mujeres posmenopáusicas con CaM, no se encontró diferencia significativa ($p= 0.7233$) en cuanto a la expresión de la irisina en el tejido tumoral mamario, al ser estratificada la población de acuerdo con la presencia o ausencia de DM2.

Como complemento de este estudio, se propuso analizar la expresión de la irisina en las líneas celulares MCF-7 (CaM luminal A), BT-474 (CaM luminal B), SKBR-3 (CaM HER2+), MDA-MB-231 (CaM triple negativo) y en una línea no tumorigénica: MCF-10A (mastopatía fibroquística). El objetivo del estudio *in vitro* fue esclarecer si la célula cancerosa es capaz de expresar a la irisina sin la influencia del medio que la rodea en los tejidos. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de la irisina se encuentra presente en todas las líneas celulares con las que se trabajó, siendo altamente positiva para la línea de CaM luminal B (BT-474), positiva para las líneas CaM luminal A (MCF-7) y HER2 (SKBR-3) y débilmente positiva para CaM con subtipo triple negativo (MDA-MB-231) y para la línea celular correspondiente a una enfermedad benigna (MCF-10A). Los hallazgos de la expresión débilmente positiva para la línea MCF-10A concuerdan con los resultados del estudio realizado por Kuloglu y cols. (2016), en el cual la expresión de irisina en el tejido mamario sano fue nula en relación con el tejido tumoral. Estos resultados nos indican que las células tumorales tienen la capacidad de sintetizar y expresar a la irisina sin ser necesarios los estímulos extracelulares; sin embargo, dichos estímulos ejercen influencia sobre la regularización de la expresión de la proteína. La diversidad en cuanto a las características moleculares particulares de cada línea celular confiere un patrón distinto de expresión de la irisina entre ellas.

La expresión de la irisina en las líneas celulares pertenecientes a los distintos subtipos moleculares de CaM, no se relacionó con la expresión en nuestra población al

evaluarse de acuerdo con el subtipo molecular diagnosticado para cada mujer. Lo anterior se debe a que el CaM es una enfermedad heterogénea que puede presentar no solo diferentes clonas de células en un mismo tumor, sino también que diversos estímulos (como la expresión de adipocinas, hormonas, factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias, entre otros) influyen en su desarrollo y progresión, otorgándole a cada tumor características moleculares únicas (Weigelt y cols., 2009).

Es importante señalar también que nuestro estudio es el primero en evaluar la expresión de la irisina en el tejido tumoral de CaM de mujeres posmenopáusicas, a través del empleo del software IHC Profiler para ImageJ, permitiéndose un análisis estandarizado para todas las muestras, un menor consumo de tiempo y la disminución del sesgo ocasionado por las variaciones inter observador.

Los resultados obtenidos de nuestro estudio abren el camino en la investigación de la irisina en el contexto de CaM en la mujer posmenopáusica, por lo que el siguiente paso sería el de realizar un seguimiento de estas mujeres, para evaluar si los valores de irisina son posibles marcadores para una mayor supervivencia libre de enfermedad o una recurrencia de este cáncer.

Dentro de las perspectivas para esta línea de investigación, un punto de gran importancia es la vía de acción de la irisina, la cual no ha sido del todo dilucidada. Bostrom y cols., en 2012, fueron los primeros en describir que esta proteína ejercía su principal función en células del tejido adiposo, induciendo la expresión de genes relacionados con la termogénesis, entre los que se destaca el de la UCP1, con lo que a nivel mitocondrial se promovía la pérdida de energía en forma de calor. Sin embargo, en la actualidad se desconoce el receptor de irisina y la vía involucrada en este proceso.

Otros estudios han relacionado a la irisina con la activación de vías como p38/MAPK (Askari y cols., 2018), AMPK-eNOS (Zhang y cols., 2015), para

contrarrestar la inflamación y el estrés oxidativo. El papel que podría desempeñar la irisina en la célula cancerosa de mama en un ambiente de obesidad es un tema aun por esclarecer y que puede aportar valiosa información para la prevención y tratamiento de esta patología.

13. CONCLUSIONES

Este estudio, ha sido el primero en determinar la expresión, a nivel de proteína, de la irisina en el tejido tumoral mamario de mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama infiltrante no hereditario, al comparar dicha expresión entre los diferentes grupos de peso y al determinar la influencia que la obesidad posee sobre la expresión de esta proteína en el cáncer de mama *in vivo*.

Por otro lado, se demostró la capacidad que poseen las células tumorales de cáncer de mama, para expresar a la irisina *in vitro* de manera independiente a los estímulos externos.

El empleo de un software para llevar a cabo el análisis cualitativo de la expresión de la irisina, representó un método estandarizado y con un menor sesgo inter observador para la realización de este tipo de ensayos.

14. BIBLIOGRAFÍA

Agnoli C, Gioni S, Pala V, Allione A, Matullo G, Gaetano C, Tagliabue G, Sieri S, Krogh V. Biomarkers of inflammation and breast cancer risk: a case-control study nested in the EPIC-Varese cohort. *Sci Rep* 2017; 7(1):12708.

AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition, The American College of Surgeons (ACS), Chicago, Illinois. 2018.

American Cancer Society 2018. <https://www.cancer.org/es.html>.

Arce-Salinas C, Aguilar-Ponce J, Villareal-Garza C, Lara-Medina F, Olvera-Caraza D, Alvarado-Miranda A, Flores-Díaz D, Mohar A. Overweight and obesity as poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 146(1):183-188.

Argolo D, Clifford H, Iyengar N. The Impact of Obesity on Breast Cancer. *Current Oncology Reports* 2018; 20:47.

Arnold M, Lietzmann M, Freisling H, Bray F, Romieu I, Renehan A, Soerjomataram I. Obesity and cancer: An update of the global impact. *Cancer Epidemiol* 2016; 41:8-15.

Arthur R, Wassertheil-Smoller S, Manson J, Luo J, Snetselaar L, Hastert T, Caan B, Qi L, Rohan T. The Combined Association of Modifiable Risk Factors with Breast Cancer Risk in the Women's Health Initiative. *Cancer Prev Res (Phila)* 2018;11(6):317-326.

Askari H, Rajani SF, Poorebrahim M, Haghi-Aminjan H, Raeis-Abdollahi E, Abdollahi M. A glance at the therapeutic potential of irisin against diseases involving inflammation, oxidative stress, and apoptosis: An introductory review. *Pharmacol Res* 2018; 129:44-55.

Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Cakmak T, Albayrak S, Gungor S, Colakoglu N, Ozercan I. A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues. *Peptides* 2014; 61:130-136.

Bagaria S, Ray P, Sim M, Ye X, Shamonki J, Cui X, Giuliano A. Personalizing breast cancer staging by the inclusion of ER, PR, and HER2. *JAMA Surg.* 2014; 149(2):125-129.

Beltran H, Soneji S, Crimmins E. Past, Present, and Future of Healthy Life Expectancy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5:a025957.

Blücher C, Stadler S. Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017; 8:293.

Bostrom P, Wu J, Jedrychowski M, Korde A, Ye L, Lo J, Rasbach K, Bostrom E, Choi J, Long J, Kajimura S, Zingaretti M, Vindi B, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi S, Spiegelman B. A PGC1a-dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382):463-468.

Bougaret L, Delort L, Billard H, Le Huede C, Boby C, De la Foye A, Rossary A, Mojallal A, Damour O, Auxenfans C, Vasson MP, Caldefie-Chezet F. Adipocyte/breast cancer cell crosstalk in obesity interferes with the anti-proliferative efficacy of tamoxifen. *PLoS One* 2018; 13(2):e0191571.

Calle E, Rodríguez C, Walker-Thurmond K, Thun M. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *NEJM* 2003; 348(17):1625-1638.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2017. <https://www.cdc.gov/cancer/dcpc/about/index.htm>.

Cha Y, Koo J. Adipokines as therapeutic targets in breast cancer treatment. *Expert Opin Ther Targets* 2018. [Epub ahead of print].

Chamberlin T, D'Amato J, Arendt L. Obesity reversibly depletes the basal cell population and enhances mammary epithelial cell estrogen receptor alpha expression and progenitor activity. *Breast Cancer Res* 2017; 19(1):128.

Chan D, Norat T. Obesity and breast cancer: not only a risk factor of the disease. *Curr Treat Options Oncol* 2015; 16(5):22.

Chan D, Vieira A, Aune D, Bandera E, Greenwood D, McTiernan A, Navarro D, Thune I, Vieira R, Norat T. Body mass index and survival in women with breast cancer-systemic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. *Ann Oncol* 2014; 25(10):1901-1914.

Chlebowski R, Luo J, Anderson G, Barrington W, Reding K, Simon M, Manson J, Rohan T, Wactawski-Wende J, Lane D, Strickler H, Mosaver-Rahmani Y, Freudenheim J, Saquib N, Stefanick M. Weight loss and breast cancer incidence in postmenopausal women. *Cancer* 2018. [Epub ahead of print].

Choi J, Cha Y, Koo J. Adipocyte biology in breast cancer: From silent bystander to active facilitator. *Prog Lipid Res* 2018; 69:11-20.

Crean-Tate K, Reizes O. Leptin Regulation of Cancer Stem Cells in Breast and Gynecologic Cancer. *Endocrinology* 2018; 159(8):3069-3080.

Crujeiras A, Pardo M, Casanueva F. Irisin: 'fat' or artefact. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 82(4):467-74.

Da Silva I, Da Costa Vieira R, Stella C, Loturco E, Carvalho A, Veo C, Neto C, Silva S, D'Amora P, Salzgeber M, Matos D, Silva C, Oliveira J, Rabelo I, Yamakawa P, Maciel R, Biscolla R, Chiamolera M, Fraietta R, Reis F, Mori M, Marchioni D, Carioca A, Maciel G, Tomioka R, Baracat E, Silva C, Granato C, Diaz R, Scarpellini B, Egle D, Fiegl H, Himmel I, Troi C, Nagourney R. Inborn-like errors of metabolism are determinants of breast cancer risk, clinical response and survival: a study of human biochemical individuality. *Oncotarget* 2018; 9(60):31664-31681.

Dhalwani N, Zaccardi F, Davies M, Khunti K. Body mass index and mortality in people with and without diabetes: A UK Biobank study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2018. [Epub ahead of print].

Dee A, Kearns K, O'Neill C, Sharp L, Staines A, O'Dwyer V, Fitzgerald S, Perry I. The direct and indirect costs of both overweight and obesity: a systematic review. *BMC Res Notes* 2014; 7:242.

Divella R, De Luca R, Abbate I, Naglieri E, Daniele A. Obesity and cancer: the role of adipose Tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. *J Cancer* 2016; 7(15):2346-2359.

Druesne-Pecollo N, Touvier M, Barrandon E, Chan D, Norat T, Zelek L, Hercberg S, Latino-Martel P. Excess body weight and second primary cancer risk after breast cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 135(3):647-654.

Duran I, Gülçelik N, Ünal M, Topçuoğlu C, Sezer S, Tuna M, Berker D, Güler S. Irisin levels in the progression of diabetes in sedentary women. *Clin Biochem* 2015; 48(18):1268-1272.

El-Lebedy D, Ibrahim A, Ashmawy I. Novel adipokines vaspin and irisin as risk biomarkers for cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*. 2018. [Epub ahead of print].

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición medio camino 2016. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, México.

Engin A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960:571-606.

Fan W, Evans R. Exercise Mimetics: Impact on Health and Performance. *Cell Metab* 2017; 25(2):242-247.

Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppalapati A, Luu H, Haydon R, He T, Ren G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* 2018; 5(2):77-106.

Fenzl A, Kiefer F. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014; 19(1):25-37.

Fletcher S, Sacca P, Pistone-Creydt M, Coló F, Serra M, Santino F, Sasso C, López-Fontana C, Carón R, Calvo J, Pistone-Creydt V. Human breast adipose tissue: characterization of factors that change during tumor progression in human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 7(1):26.

Fontanella C, Lederer B, Gade S, Vanoppen M, Blohmer J, Costa S, Denkert C, Eidtmann H, Gerber B, Hanusch C, Hilfrich J, Houber J, Schneeweiss A, Paepke S, Jackisch C, Mehta K, Nekljudova V, Untch M, Neven P, Von Minckwitz G, Loibl S. Impact of body mass index in neoadjuvant treatment outcome: a pooled analysis of eight prospective neoadjuvant breast cancer trials. *Breast Can Res Treat* 2015; 150(1):127-139.

Gaggini M, Cabiati M, Del Turco S, Navarra T, De Simone P, Filipponi F, Del Ry S, Gastaldelli A, Basta G. Increased FNDC5/Irisin expression in human hepatocellular carcinoma. *Peptides* 2017; 88:62-66.

Gallagher E, LeRoith D. Obesity and Diabetes: The increased risk of cancer and cancer-related mortality. *Physiol Rev* 2015; 95(3):727-748.

Gannon N, Vaughan R, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Trujillo K. Effects of the exercise-inducible myokine irisin on malignant and non-malignant breast epithelial cell behavior in vitro. *Int J Cancer* 2015; 136(4):E197-202.

Gérard C, Brown KA. Obesity and breast cancer - Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 466:15-30.

GLOBOCAN, 2018. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2018. <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>.

González-Muniesca P, Martínez M, Frank B, Despres J, Matsuzawa Y, Loos R, Moreno L, Bray G, Martínez A. Obesity. *Nature Reviews Disease Primer* 2017; 3:1-18.

González Niño L, Ávila Garavito A, Echeverri Jaramillo C, Jaramillo Velásquez S, Salazar Corcho R, Aristizábal Bernal B. Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol* 2007; 11(1):40-57.

Gravena A, Romeiro Lopes T, Demitto M, Borghesan D, Dell' Agnolo C, Brischiliari S, Carvalho M, Pelloso S. The Obesity and the Risk of Breast Cancer among Pre and Postmenopausal Women. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018; 19(9):2429-2436.

Grossmann M, Cleary M. The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis - focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie* 2012; 94(10):2164-2171.

Huh J, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini M, Schneider B, Mantzoros CS. FND5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism* 2012; 61(12):1725-1738.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2015. <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2016. <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/mortalidad/>.

Jonas R, Constantinidou A, Reis-Filho J. Molecular Classification of Breast Cancer. *Surgical Pathology* 2012; 5:701-717.

Kazeminasab F, Marandi S, Ghaedi K, Safaeinejad Z, Esfarjani F, Nasr-Esfahani M. A comparative study on the effects of high-fat diet and endurance training on the PGC-1 α FND5/irisin pathway in obese and nonobese male C57BL/6 mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 2018; 43(7):651-662.

Khan S, Shukla S, Sinha S, Meeran S. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24(6):503-513.

Kitahara C, Flint A, Berrington A, Bernstein L, Brotzman M, Maclnnis R, Moore S, Robien K, Rosenberg P, Singh P, Weiderpass E, Adami H, Anton-Culver H, Ballard-Berbash R, Buring J, Freedman D, Fraser G, Freeman L, Gapstur S, Gaziano J, Giles G, Hakansson N, Hoppin J, Hu F, Koenig K, Linet M, Park Y, Patel A, Purdue M, Schairer C, Sesso H, Visvanathan K, White E, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Hartge P. Association between Class III Obesity (BMI of 40-59 kg/m²) and Mortality: A pooled Analysis of 20 Prospective Studies. *PLOS Medicine* 2014; 11(7):e1001673.

Kuloglu T, Celik O, Aydin S, Hanifi Ozercan I, Acet M, Aydin Y, Artas G, Turk A, Yardim M, Ozan G, Hanifi Yalcin M, Kocaman N. Irisin immunostaining characteristics of breast and ovarian cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016; 62(8):40-44.

Kyriakoula M, Dimitris T, Antonopoulos A, Stefanadi E, Stefanadis C. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *Int J Cardiol* 2010; 138(1):3-8.

Laloo F, Evans D. Familial breast cancer. *Clin Genet* 2012; 82(2):105-114.

Li J, Han X. Adipocytokines and breast cancer. *Curr Probl Cancer* 2018; 42(2):208-214.

Li K, Hüsing A, Kaaks R. Lifestyle risk factors and residual life expectancy at age 40: a German cohort study. *BMC Med* 2014; 12:59.

Liu X, mujahid H, Rong Q, Lu W, Zhang P, Li N, Liang E, Wnag Q, Tang D, Li N, Ji X, Chen Y, Zhao Y, Zhang M. Irisin inhibits high glucose-induced endothelial-to-mesenchymal transition and exerts a dose-dependent bidirectional effect on diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med* 2017; 22(2):808-822.

Ma Y, Ren Y, Dai Z, Wu C, Ji Y, Xu J. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv Clin Exp Med* 2017; 26(3):421-426.

Makama M, Drukker C, Rutgers E, Slaets L, Cardoso F, Rookus M, Tryfonidis K, Van't Veer L, Schmidt M. An association study of established breast cancer reproductive and lifestyle risk factors with tumour subtype defined by the prognostic 70-gene expression signature (MammaPrint®). *Eur J Cancer* 2017; 75:5-13.

Martin-Rodríguez E, Guillen-Grima F, Martí A, Brugos-Larumbe A. Comorbidity associated with obesity in a large population: the APNA study. *Obes Res Clin Pract* 2015; 9(5):435-447.

Mazur-Bialy AI. Irisin acts as a regulator of macrophages host defense. *Life Sci*. 2017 May 1;176:21-25.

Mazur A, Bilski J, Pochec E, Brzozowski T. New insight into the direct anti-inflammatory activity of a myokine irisin against proinflammatory activation of adipocytes. Implication for exercise in obesity. *J Physiol Pharmacol* 2017; 68(2):243-251.

Moreno-Navarrete J, Ortega F, Serrano M, Guerra E, Pardo G, Tinahones F, Ricart W, Fernández-Real J. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(4):E769-78.

Namazi N, Irandoost P, Heshmati J, Larijani B, Azadbakht L. The association between fat mass and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr*. 2018; S0261-5614(18)32451-8.

Nagai M, Kuriyama S, Kakizaki M, Ohmori-Matsuda K, Sone T, Hozawa A, Kawado M, Hashimoto S, Tsuji I. Impact of obesity, overweight and underweight on life expectancy and lifetime medical expenditures: the Ohsaki cohort study. *BMJ Open* 2012; 2(3): e000940.

National Cancer Institute, 2017. <https://www.cancer.gov/about-cancer>.

Neuhouser M, Aragaki A, Prentice R, Manson J, Chlebowski R, Carty C, Ochs-Balcom H, Thomson C, Caan B, Tinker J, Peragallo R, Knudtson J, Anderson G. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk. *JAMA Oncol* 2015; 1(5):611-621.

Nickel A, Blücher C, Kadri OA, Schwagarus N, Müller S, Schaab M, Thiery J, Burkhardt R, Stadler SC. Adipocytes induce distinct gene expression profiles in mammary tumor cells and enhance inflammatory signaling in invasive breast cancer cells. *Sci Rep.* 2018; 8(1):9482.

Nie Y, Liu D. N-Glycosylation is required for FNDC5 stabilization and irisin secretion. *Biochem J* 2017; 474(18):3167-3177.

Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos, 2017. www.oecd.org/health/obesity-update.

Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* 2011; 62:233-247.

Panati K, Suneetha Y, Narala VR. Irisin/FNDC5--An updated review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016; 20(4):689-697.

Park M, Kim D, Choi J, Heo Y, Park S, New role of irisin in hepatocytes: the protective effect of hepatic steatosis in vitro. *Cell Signal* 2015; 1831–1839.

Playdon M, Bracken M, Sanft T, Ligibel J, Harrigan M, Irwin ML. Weight gain after breast cancer diagnosis and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107(12): djv275.

Provatopoulou X, Georgiou G, Kalogera E, Kalles V, Matitou M, Papapanagiotou I, Sagkriotis A, Zografos G, Gounaris A. Serum irisin levels are lower in patients with breast cancer: association with disease diagnosis and tumor characteristics. *BMC Cancer* 2015; 15:898.

Reilly S, Saltiel A. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology* 2017; 3:633-645.

Renehan A, Zwahlen M, Egger M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nature Reviews Cancer* 2015; 15:484-498.

Ruiz J, Martinez-Tellez B, Sanchez-Delgado G, Osuna-Prieto F, Rensen P, Boon M. Role of Human Brown Fat in Obesity, Metabolism and Cardiovascular Disease: Strategies to Turn Up the Heat. *Prog Cardiovasc Dis* 2018; 61(2):232-245.

Ryan JG. Cost and policy implications from the increasing prevalence of obesity and diabetes mellitus. *Gend Med* 2009; 6(Suppl 1):86-108.

Savolainen H, Vihma V, Leidenius M, Wang F, Turpeinen U, Hamalainen E, Tikkanen M, Mikkola T. Breast Adipose Tissue Estrogen Metabolism in Postmenopausal Women With or Without Breast Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:E2661-E2667.

Scholz C, Andergassen U, Hepp P, Schindlbeck C, Friedl T, Harbeck N, Kiechle M, Sommer H, Hauner H, Friese K, Rack B, Janni W. Obesity as an independent risk factor for decreased survival in node-positive high-risk breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 151(3):569-576.

Schvartsman G, Gutierrez-Barrera A, Song J, Ueno N, Peterson S, Arun B. Association between weight gain during adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer and survival outcomes. *Cancer Med* 2017; 6(11):2515-2522.

Song H, Wu F, Zhang Y, Zhang Y, Wang F, Jiang M, Wang Z, Zhang M, Li S, Yang L, Wang XL, Cui T, Tang D. Irisin promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation through the erk signaling pathway and partly suppresses high glucose-induced apoptosis. *PLoS One* 2014; e110273.

Soriano R, Ponce de León S, García R, García E, Méndez J. High knowledge about obesity and its health risks, with the exception of cancer, among Mexican individuals. *J Cancer Educ* 2012; 27(2):306-311.

Stengel A1, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Elbelt U, Kobelt P, Klapp B. Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity-correlation with body mass index. *Peptides* 2013; 39:125-130.

Sultana R, Katakai A, Borthakur B, Basumatary T, Bose S. Imbalance in leptin-adiponectin levels and leptin receptor expression as chief contributors to triple negative breast cancer progression in Northeast India. *Gene* 2017; 621:51-58.

Sun L, Zhu Y, Qian Q, Tang L. Body mass index and prognosis of breast cancer: An analysis by menstruation status when breast cancer diagnosis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(26):e11220.

Tavassoli F, Devilee P. (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press: Lyon 2003.

Thomas R, Kenfield A, Jimenez A. Exercise-induced biochemical changes and their potential influence on cancer: a scientific review. *Br J Sports Med* 2017; 51(8): 640–644.

Ulaganathan V, Kandiah M, Shariff Z. A case-control study on the association of abdominal obesity and hypercholesterolemia with the risk of colorectal cancer. *J Carcinog* 2018; 17:4.

Van der Heijden R, Sheedfar F, Morrison M, Hommelberg P, Kor D, Kloosterhuis N, Gruben N, Youssef SA, de Bruin A, Hofker M, Kleemann R, Koonen D, Heeringa P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)* 2015; 7(4):256-68.

Varela-Rodríguez B, Pena-Bello L, Juiz-Valiña P, Vidal-Bretal B, Cordido F, Sangiao-Alvarellos S. FNDC5 expression and circulating irisin levels are modified by diet and hormonal conditions in hypothalamus, adipose tissue and muscle. *Sci Rep.* 2016; 6:29898.

Varghese F, Bukhari A, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One* 2014; 9(5):e96801.

Vaughan R, Gannon N, Barberena M, García-Smith R, Bisoffi M, Mermier C, Conn C, Trujillo K. Characterization of the metabolic effects of irisin on skeletal muscle in vitro. *Diabetes Obes Metab.* 2014; 16(8):711-718.

Vallianou N, Evangelopoulos A, Kazazis C. Metformin and cancer. *Rev Diabet Stud.* 2013 Winter;10(4):228-235.

Wang J, Yang D, Chen Z, Gou B. Associations of body mass index with cancer incidence among populations, genders, and menopausal status: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 2016; 42:1-8.

Wang Y, Lehuede C, Laurent V, Dirat B, Dauvillier S, Bochet L, Le Gonidec S, Escorrou G, Valet P, Muller C. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett* 2012; 324(2):142-151.

Weigelt B, Reis-Filho J. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?. *Nat. Rev. Clin. Oncol* 2009; 6:718-730.

Wensveen FM, Valentić S, Šestan M, Turk Wensveen T, Polić B. The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur J Immunol.* 2015; 45(9):2446-2456.

Wong E, Tanamas S, Wolfe R, Backholer K, Stevenson C, Abdullah A, Peeters A. The role of obesity duration on the association between obesity and risk of physical disability. *Obesity* 2015; 23(2):443-447.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: AICR, 2007.

World Health Organization, 2018. www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es.

World Health Organization Global Health Observatory (GHO) data, 2016. www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/.

Xi L, Shujun W, Xueju W, Lijuan Z, Haidong Z, Le Z. Leptin promotes the growth of breast cancer by upregulating the Wnt/ β -catenin pathway. *Exp Ther Med* 2018; 16(2): 767–771.

Zhang Y, Xie C, Wang H, Foss R, Clare M, George E, Li S, Katz A, Cheng H, Ding Y, Tang D, Reeves WH, Yang L. Irisin exerts dual effects on browning and adipogenesis of human white adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 311(2):E530-41.

Zhang Z, Zhang X, Li H, Liu T, Zhao Q, Huang L, Cao Z, He L, Hao D. Serum irisin associates with breast cancer to spinal metastasis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(17):e0524.

Zhao M, Sachs P, Wang X, Dumur C, Idowu M, Robila V, Francis M, Ware J, Beckman M, Rizki A, Holt S, Elmore L. Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type. *Cancer Biol Ther* 2012; 13(9):782-792.

Zhao H, Wang J, Fang D, Lee O, Chatterton R, Stearns V, Khan S, Bulun S. Adiposity Results in Metabolic and Inflammation Differences in Premenopausal and Postmenopausal Women Consistent with the Difference in Breast Cancer Risk. *Horm Cancer* 2018; 9(4):229-239.

Zhu D, Wang H, Zhang J, Zhang X, Xin C, Zhang F, Lee Y, Zhang L, Lian K, Yan W, Ma X, Liu Y, Tao L, Irisin improves endothelial function in type 2 diabetes through reducing oxidative/nitrative stresses. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015; 87:138–147.

Zobel E, Hansen T, Rossing P, Von Scholten B. Global Changes in Food Supply and the Obesity Epidemic. *Curr Obes Rep* 2016; 5(4):449-455.

Zügel M, Qiu S, Laszlo R, Bosnyák E, Weigt C, Müller D, Diel P, Steinacker J, Schumann U. The role of sex, adiposity, and gonadectomy in the regulation of irisin secretion. *Endocrine*. 2016; 54(1):101-110.

ANEXO 1. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA



Título del protocolo:

“ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LA IRISINA, EN CÁNCER DE MAMA INFILTRANTE NO HEREDITARIO, EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS CON ÍNDICES DIFERENTES DE MASA CORPORAL”

Investigadores participantes:

Instituto de Enfermedades de la Mama FUCAM: Dr. Juan Alberto Tenorio Torres.

Unidad de Investigación en Obesidad, Facultad de Medicina, UNAM: Dr. Juan Pablo Méndez Blanco.

Sede donde se tomará la muestra para el estudio: Instituto de Enfermedades de la Mama FUCAM

Sede donde se realizará el procesamiento de la muestra: Unidad de Investigación en Obesidad, Facultad de Medicina, UNAM.

Nombre de la paciente: _____

No. de expediente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

El objetivo de éste estudio es comparar la expresión de la proteína de irisina en el tejido tumoral mamario, con la expresión en el tejido mamario adyacente, en mujeres posmenopáusicas con diferentes índices de masa corporal.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente; sin embargo, en estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha observado que la presencia de algunas proteínas o sustancias encontradas en los tejidos pueden asociarse a la agresividad de algunas enfermedades.

Con éste estudio, mediante el trabajo con el tejido tumoral mamario y con el tejido mamario adyacente, se podrá conocer el porqué las mujeres que presentan sobrepeso u obesidad desarrollan tumores de mama más agresivos que aquellos que se observan en mujeres de peso normal.

Este estudio permitirá que en un futuro otras pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido y tomarse medidas preventivas.

RIESGOS Y MOLESTIAS

Para la obtención del bloque de parafina, ninguno.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para este estudio se le pedirá acceso a su tejido tumoral mamario y tejido mamario adyacente fijado en parafina para el análisis de marcadores.

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, por lo que convengo en participar en este estudio de investigación y autorizo la donación de mi bloque de parafina para su estudio.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

Asimismo, se me ha informado que ésta muestra podrá ser utilizada en otros estudios relacionados con cáncer, con el fin de esclarecer los posibles mecanismo que generan esas enfermedades.

El investigador se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado a la investigación o el tratamiento. La información obtenida en éste estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Del mismo modo, no tendré que hacer gasto alguno durante el estudio, ni recibiré pago por mi participación.

Datos del investigador con quien pueda comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dr. Juan Alberto Tenorio Torres; teléfono de contacto: 5678 0600 ext 120. Instituto de Enfermedades de la Mama FUCAM: Calle Bordo no. 100, Col. Ejido de Santa Úrsula Coapa.

Fecha y firma del participante

Investigador responsable

Testigo

Testigo

ANEXO 2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Con el fin de establecer un marcaje adecuado para los tejidos de nuestro estudio, se llevó a cabo una curva de dilución del anticuerpo primario (Irisin H-067-17, Phoenix Phamaceuticals), empleándose las diluciones (1:100, 1:300 y 1:600) en una muestra de tejido tumoral mamario de una mujer posmenopáusica con diagnóstico de CaM infiltrante no hereditario y con un IMC de peso normal (Figura 3). La dilución 1:600 presentó adecuada intensidad de marcaje sin que se presentase interferencia de uniones inespecíficas que pudieran aportar resultados falsos positivos, por lo que se eligió como óptima para llevar a cabo nuestro estudio.

Figura 3 Estandarización del anticuerpo primario

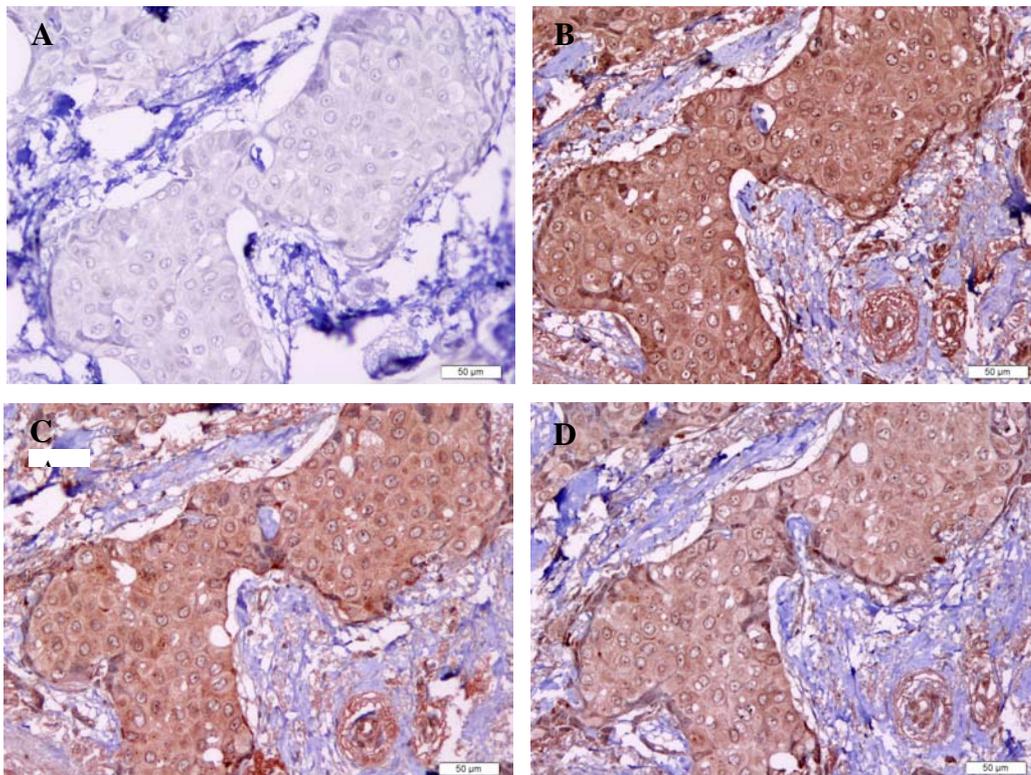


Figura 3: Imágenes tomadas con microscopio de campo claro en objetivo 20X. Coloración rojo-café indica marcaje del anticuerpo. A: control negativo. B: dilución 1:100. C: dilución 1:300. D: dilución 1:600.

ANEXO 3. CONTROL POSITIVO PARA ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

La irisina es una proteína expresada y secretada principalmente por el tejido muscular en respuesta a la actividad física (Bostrom y cols., 2012), por lo que como control positivo se empleó tejido muscular sano, incubándose de igual forma con el anticuerpo contra irisina H-067-17 (42-112) a una dilución de 1:600.

Figura 4 Expresión de la irisina en tejido muscular sano

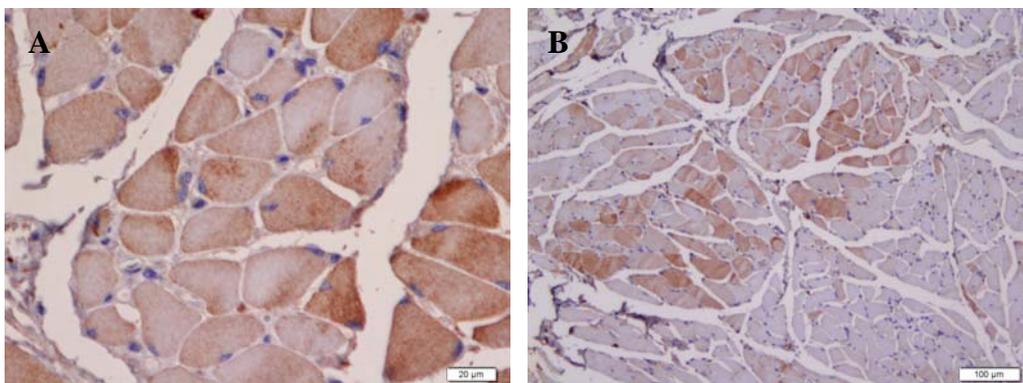


Figura 4: Imágenes tomadas con microscopio de campo claro. Coloración rojo-café indica marcaje del anticuerpo. A: expresión en tejido muscular 20X. B: expresión en tejido muscular 10X.

ANEXO 4. SCORE HISTOLÓGICO POR INTENSIDAD DE MARCAJE

De acuerdo al método descrito por Varghese y cols. (2014), fueron determinados los valores de intensidad de color de los píxeles, a partir del análisis de imágenes digitales; los valores de intensidad de píxel para cualquier rango de color se establecieron de 0 a 255, en donde 0 representa el tono más oscuro del color y 255 representan el tono más claro. Lo anterior permitió establecer las 4 zonas asignadas para el H-Score: alta positiva, positiva, débil positiva y negativa (Imagen X). Se encontró que el rango de intensidad para la zona positiva oscilaba entre 61 y 120; 121 a 180 para la zona positiva baja; y 181 a 235 para la zona negativa. Se determinó que los píxeles con valores de intensidad que oscilan entre 235 y 255 representan predominantemente tejidos grasos que ocasionalmente están presentes pero que típicamente no contribuyen a la puntuación patológica y, por lo tanto, se excluyeron de las zonas de determinación de puntuación.

Figura 5. Zonas asignadas por H-Score

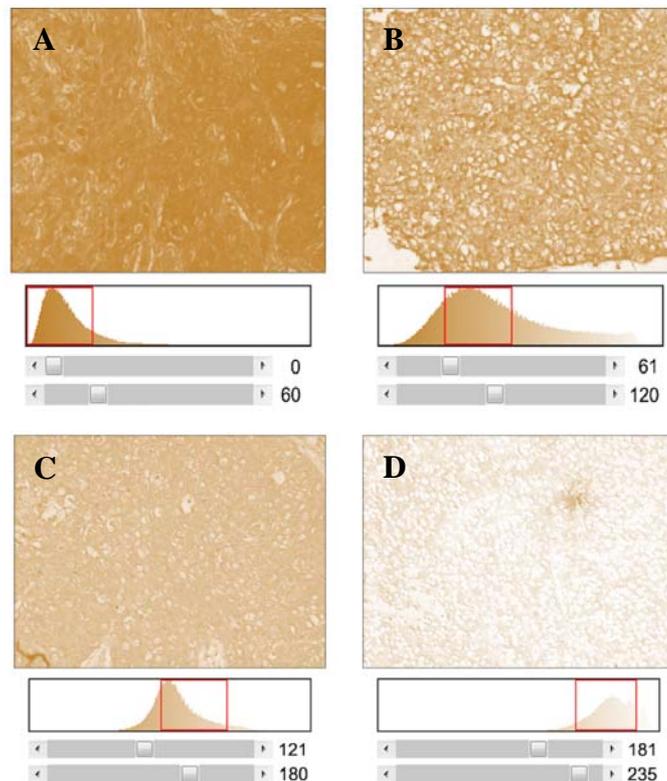


Figura 5: A: zona alta positiva. B: zona positiva. C: zona débil positiva. D: zona negativa