



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
"SALVADOR ZUBIRÁN"**

**"EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE CÉLULAS DERIVADAS DE CULTIVOS PRIMARIOS  
DE CÁNCER DE MAMA Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE PTP1B"**

**TESIS DE POSGRADO  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA**

**ANDREA CASTRO SÁNCHEZ**

**TUTOR**

**DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ**

**CO-TUTORES**

**DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ  
DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ**



México, D.F.

2014



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.



Facultad de Medicina



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**AUTORIZACIÓN DE TESIS:  
EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE CÉLULAS DERIVADAS DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE MAMA Y  
SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE PTP1B.**

**DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ**

Profesor titular del Curso de Especialización en Oncología Médica  
Tutor de Tesis  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ**

Investigador en Ciencias Médicas  
Co-Tutor de Tesis  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA-SÁNCHEZ**

Investigador en Ciencias Médicas  
Co-Tutor de Tesis  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES**

Director de Enseñanza  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



**INCMNSZ  
INSTITUTO NACIONAL  
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
DR. "SALVADOR ZUBIRÁN"  
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA  
México, D.F.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la vida por haberme permitido llegar hasta aquí y cumplir uno de mis más grandes anhelos.

Esta tesis va dedicada principalmente a mi papá y a mi abuela, que siempre han sido mi inspiración, y que su lucha me recuerda por qué estoy aquí y hacia dónde voy.

A Erick, por su amor, por su infinita paciencia, y por la familia que hemos formado y que pronto será más numerosa. Sebastián, tú también ya eres un gran motor para mí y para tu papá y ya sentimos un amor muy grande hacia ti.

A mi mamá, a mi hermana y a mis tíos y tías por estar ahí incondicionalmente.

A mis 2 grandes ejemplos médicos, mi padrino y Cynthia. Siempre buscaré ser aunque sea un poco de lo buenos médicos y buenas personas que son.

A Mary y Pepe, porque a pesar de todo lo que les hice pasar fueron grandes guías y maestros para el desarrollo de esta tesis. Gracias por tenerme paciencia y por ser tolerantes, gracias por escucharme. No hay palabras para expresarles mi gratitud y mi aprecio.

Al Dr. León, por ser un excelente maestro no solo de la Oncología sino de la vida. Siempre le agradeceré que gracias a su ayuda el INNSZ ha sido mi casa. A todos los demás profesores de Oncología: Robert, Ale, Yanin, Eli, Dr. Zentella y Dr. Huitzil, gracias por todas sus enseñanzas y por su amistad.

A mis compañeros de Oncología: Enrique, Maite y Paco, pero especialmente a Pier. Sin duda no pude haber tenido mejor compañero durante estos meses. Gracias por tu ayuda y tu amistad incondicional. Eres un gran médico, pero aún mejor persona. También extendiendo este agradecimiento a Paty.

A todos mis amigos, especialmente a Fernando, Roberta, Ana, Javier y Lulú, por su compañía durante estos años de travesía llamada residencia.

Y finalmente, gracias al INNSZ, que siempre será mi casa, y a todos y cada uno de los pacientes que han confiado en mí y que me han permitido aprender no solo Oncología sino muchas otras cosas más. Me llevo la mística del INNSZ a donde vaya.

# EFFECTO DE LA METFORMINA SOBRE CÉLULAS DERIVADAS DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE MAMA Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE PTP1B.

## RESUMEN

**Antecedentes:** El cáncer de mama desde 2006 representa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, con el 13.6% de las defunciones. Dentro de los factores de riesgo se encuentran los reproductivos y los no asociados a la reproducción como obesidad y el sobrepeso. Se ha demostrado que la obesidad es un factor de riesgo para cáncer de mama, asociado con un mayor riesgo de recurrencia y menor supervivencia. Además, se asocia a un aumento en la frecuencia de diabetes mellitus, que también es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de neoplasias y condiciona a un mayor riesgo de muerte por cáncer de mama. Desde 1950, las biguanidas como la metformina son la piedra angular del tratamiento de la diabetes mellitus y también se utilizan como parte del tratamiento de la obesidad. Se han publicado varios estudios que han asociado el uso de metformina en diabéticos con menor incidencia de cáncer, con múltiples mecanismos propuestos. Dentro de las vías metabólicas implicadas en estas dos patologías se encuentra la vía de las adipocinas, el eje insulina-glucosa y la activación del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (del inglés Insulin like growth factor 1 receptor, IGF1R). Uno de los reguladores negativos de estas vías es la fosfatasa de tirosina PTP1B, que se ha propuesto como blanco terapéutico para tratamiento de estas patologías. Esta fosfatasa también puede actuar como promotor y supresor de tumores. Se conoce poco sobre el papel de PTP1B sobre los mecanismos por los que actúa la metformina, principalmente en la vía de IGF1R y sus consecuencias biológicas en los tumores. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la metformina sobre la proliferación, migración, y citotoxicidad en células provenientes de cultivos primarios de cáncer de mama PTP1B positivos y negativos. **Material y métodos:** Se utilizaron cultivos primarios obtenidos a partir de biopsias de pacientes con cáncer de mama, además de las líneas celulares comerciales MDA-MB-231 y SKBR3. Se evaluó la expresión de PTP1B por la técnica de Western Blot. Se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando concentraciones crecientes de metformina, ensayos de proliferación celular mediante la reducción de MTT, migración celular por medio de herida en monocapa y cámaras de Boyden, ensayos de citotoxicidad usando combinaciones de metformina con fármacos utilizados habitualmente para tratamiento de cáncer de mama (doxorrubicina, paclitaxel y lapatinib). **Resultados:** Los cultivos primarios MBCDF y MBCD4 fueron negativas para la expresión de PTP1B, mientras que los cultivos primarios MBCD5 y MBCDF-B3, así como las líneas

comerciales MDA-MB-231 y SKBR3 son positivas para PTP1B. Las células PTP1B positivas fueron resistentes al tratamiento con metformina, con una IC50 entre 50-68mM, mientras que las células PTP1B negativas tienen menor viabilidad a concentraciones bajas. En los ensayos de proliferación al añadir metformina las células PTP1B positivas no tienen un efecto significativo sobre la proliferación celular, mientras que en las PTP1B negativas hay una reducción en su tasa de proliferación con respecto a los controles, principalmente en los primeros cuatro días. En los ensayos de migración la metformina no tiene efecto sobre las células PTP1B positivas y en las células PTP1B negativas se disminuye la migración al añadir metformina. En los ensayos de citotoxicidad combinada, la metformina tiene un efecto aditivo con paclitaxel y doxorubicina en las células PTP1B negativas.

**Conclusión:** Nuestros resultados muestran que las células PTP1B positivas en presencia de metformina no sufren cambios en su capacidad de proliferación y migración, a diferencia de las células PTP1B negativas. Estos datos sugieren que pacientes con cáncer de mama positivas para PTP1B pudieran no beneficiarse del tratamiento con metformina.

## ÍNDICE

<b><i>I.</i></b>	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>5</b>
<b><i>II.</i></b>	<b>JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>11</b>
<b><i>III.</i></b>	<b>OBJETIVOS.</b>	<b>12</b>
	<i>a.</i> Objetivo general.	
	<i>b.</i> Objetivos específicos.	
<b><i>IV.</i></b>	<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>13</b>
	<i>a.</i> Hipótesis nula.	
	<i>b.</i> Hipótesis alterna.	
<b><i>V.</i></b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>14</b>
	<i>a.</i> Cultivo celular.	
	<i>b.</i> Western Blot.	
	<i>c.</i> Ensayo de citotoxicidad con metformina.	
	<i>d.</i> Ensayo de proliferación celular.	
	<i>e.</i> Ensayos de migración: herida en monocapa.	
	<i>f.</i> Ensayos de migración: cámara de Boyden.	
	<i>g.</i> Ensayos de citotoxicidad de metformina combinada con fármacos de quimioterapia.	
<b><i>VI.</i></b>	<b>RESULTADOS.</b>	<b>19</b>
	<i>a.</i> Expresión de PTP1B, HER2 e IGF1R en los cultivos primarios y líneas celulares de cáncer de mama.	
	<i>b.</i> Las células de cáncer de mama PTP1B positivas son resistentes al tratamiento con metformina.	
	<i>c.</i> Efecto de la metformina en la proliferación celular.	
	<i>d.</i> Las células PTP1B negativas tienen menor capacidad de migración con metformina.	
	<i>e.</i> La metformina tiene un efecto aditivo con paclitaxel y doxorubicina en las células PTP1B negativas.	
<b><i>VII.</i></b>	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b><i>VIII.</i></b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>32</b>

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más comúnmente diagnosticada en mujeres en el mundo, con alrededor de 1.38 millones de casos anualmente, y 460,000 muertes en 2008. En nuestro país, desde el 2006 representa la primera causa de muerte por cáncer. De acuerdo a las estadísticas del INEGI, representa el 13.6% de las defunciones por cáncer en mujeres, que lo ha convertido en un importante problema de salud pública. Desde 1980 a 2010, tanto la incidencia como la mortalidad en países en vías de desarrollo han aumentado de forma considerable, impactando en las causas de morbi-mortalidad. En México, la incidencia de cáncer de mama ha aumentado de un riesgo anual de 2% en 1980, a 5% en 2010 [1]. Existen múltiples factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama. En primer lugar se encuentran los factores reproductivos, dentro de ellos la edad, la menarca a edad temprana, la menopausia tardía, y la nuliparidad [2]. El riesgo de desarrollar cáncer de mama incrementa con la edad, encontrando un incremento importante a partir de los 50 años, principalmente de los tumores con receptores hormonales positivos. [3]. La menarca a edad temprana es un factor de riesgo importante, con un 10% de reducción de riesgo con 2 años de retraso en la menarca, ya que la menarca temprana se asocia a mayor exposición a estrógenos y a mayores niveles de estimulación hormonal durante un ciclo menstrual [4]. El primer embarazo a edad temprana se considera un factor protector, así como el número de estos, ya que los embarazos adicionales tienen una reducción relativa del 7% por cada embarazo subsecuente [5].

Existen otros factores de riesgo no asociados a los factores reproductivos, entre ellos la obesidad y el sobrepeso. Estos factores son relevantes para nuestra población, ya que de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, en las mujeres mayores de 20 años de edad, el 35.5% tiene sobrepeso (definido como índice de masa corporal (IMC) 25-30kg/m<sup>2</sup> y el 37.5% tiene obesidad (definido como IMC >30kg/m<sup>2</sup>). Las tendencias con respecto al IMC en mujeres de 20 a 49 años de 1988 a 2006 han mostrado que la prevalencia de sobrepeso incrementó 41.7% y la de obesidad 270.5%[6]. En Estados Unidos, en 2007, 4% de los nuevos casos de cáncer en hombres y 7% de los nuevos casos en mujeres se debían a la obesidad.[7] Está bien establecido que la obesidad es un factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama, especialmente en postmenopáusicas, también se ha descrito que la obesidad es un factor pronóstico independiente asociado con mayor riesgo de recurrencia y menor supervivencia al compararlo con mujeres con peso normal.[8] Recientemente, se publicó un meta-análisis que incluyó 213,075 pacientes con

cáncer de mama, con un riesgo relativo de muerte por cáncer de mama (RR) de 1.41 para mujeres obesas y de 1.07 para mujeres con sobrepeso, ambos estadísticamente significativos[9].

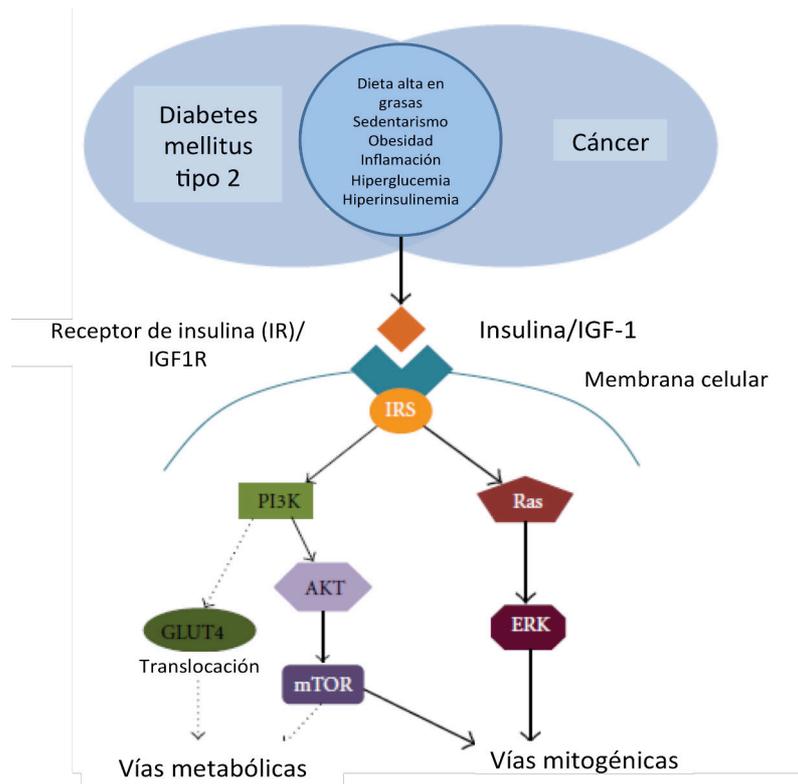
El incremento de la obesidad ha contribuido a incrementar los casos de diabetes mellitus, ya que el aumento de la grasa visceral se encuentra asociada con múltiples alteraciones metabólicas que inducen la resistencia a la insulina que da por resultado el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. En promedio, el 80% de la gente con diabetes mellitus tiene sobrepeso u obesidad. Tanto la diabetes mellitus tipo 2 como la obesidad se encuentran asociadas con múltiples complicaciones médicas, como enfermedades cardiovasculares y cáncer[10]. En México, en las últimas décadas, el número de personas que padecen diabetes se ha incrementado en México ocupando los primeros lugares en las causas de morbi-mortalidad en nuestro país. De acuerdo con la ENSANUT 2012, la proporción de adultos con diagnóstico de diabetes fue de 9.2%, la prevalencia en el grupo de mujeres de 50-59 años el 19.4% y en el grupo de mujeres de 60-69 años de 26.3%.[6]

Existen múltiples estudios que han mostrado que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen mayor riesgo de neoplasias y tienen mayor riesgo de muerte por cáncer (Hazard ratio- HR 1.49). El síndrome metabólico se caracteriza por un estado de resistencia a la insulina y aumento de insulina circulante, es un factor pronóstico importante en las pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama[11]. En un meta-análisis publicado en 2012, que incluyó 43 estudios, se encontró que existe un incremento en el riesgo de cáncer de mama del 27% en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, con un decremento al 16% cuando se realiza un ajuste al IMC, es decir que, a pesar de tener un IMC normal, existe mayor riesgo de cáncer de mama en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [12]. La existencia de hiperglucemia e hiperinsulinemia, así como otros factores asociados a diabetes mellitus, como la obesidad y la dieta alta en grasa, son factores de riesgo independientes para cáncer, lo que muestra una estrecha correlación entre estas enfermedades[13].

A pesar del poco conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la diabetes, desde 1950, las biguanidas como la fenformina y la metformina se introdujeron en el arsenal terapéutico de la diabetes mellitus y son ampliamente utilizados en el tratamiento de esta patología [14]. En los últimos años, se han publicado varios estudios epidemiológicos que han asociado el uso de metformina en diabéticos con una menor incidencia de cáncer[15, 16]. En especial, en pacientes con cáncer de mama, la metformina ha mostrado disminución en la incidencia, mayor tiempo al desarrollo de cáncer, menor mortalidad por enfermedad HER2 positiva

y reducción del riesgo de metástasis a distancia en pacientes con cáncer de mama triple negativo [17]. Se han propuesto distintos mecanismos de acción que han intentado explicar los efectos antitumorales de la metformina. Dentro de estos se encuentra la reducción de la insulina circulante y su capacidad de suprimir la gluconeogénesis hepática, y la disminución de la actividad de los ejes de la cinasa activada por AMP (del inglés AMPK), mTOR, insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina o IGF-1 [18]. Sin embargo, los resultados de diferentes estudios han sido contradictorios, ya que la activación de AMPK puede estimular neoangiogénesis y crecimiento tumoral en células de cáncer de mama, y las células resistentes a la insulina pueden presentar aumento en la fosforilación de IGF1R[19, 20]. Estos hallazgos sugieren que la supresión del eje AMPK produce una retroalimentación negativa en la señalización de IGF1R/Insulin Receptor Substrate (IRS), lo que lleva a aumento de la supervivencia celular y contrarrestando los efectos de la metformina. Por otra parte, se conoce poco sobre los mecanismos moleculares a nivel intracelular implicados en la acción antitumoral de la metformina, sobre todo en los relacionados a la vía del IGFR/IRS. Existen algunos estudios en modelos de cáncer pulmonar que han mostrado que la metformina inhibe la fosforilación del IGF1R, Akt, ERK y mTOR por un mecanismo independiente del AMPK, aunque no se ha dilucidado el mecanismo por completo [21].

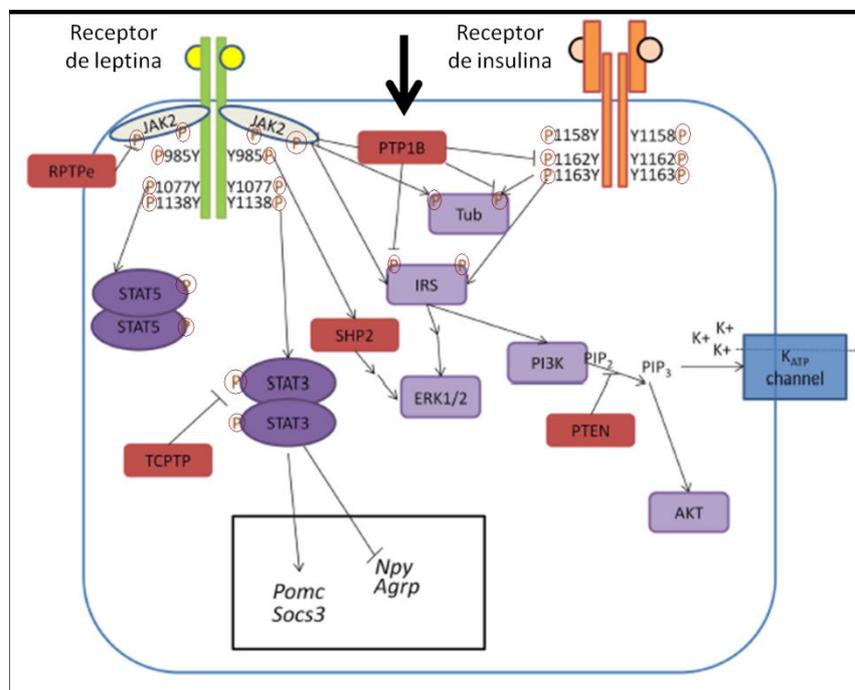
La fisiopatología común de la diabetes tipo 2 y la obesidad es muy compleja. De forma general, la diabetes tipo 2 se desarrolla en obesos como consecuencia de una respuesta inadecuada de las células beta pancreáticas y el tejido adiposo al exceso de glucosa. Dentro de las vías metabólicas que se encuentran implicadas, se encuentran la vía de las adipocinas (leptina y adiponectina), el eje insulina-glucosa, y la activación cruzada del IGF1R. La activación de IGF1R es el mecanismo más frecuentemente propuesto para explicar el incremento en la incidencia de cáncer en este grupo de pacientes[10, 13]. Tanto la insulina como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) tienen afinidad tanto por el receptor de insulina como por el IGF1R debido a su estructura similar, aunque en distinta proporción. El sistema IGF-1/IGF1R tienen efectos mitogénicos y antiapoptóticos, y la hiperinsulinemia que ocurre en los pacientes diabéticos o en los obesos resistentes a la insulina puede incrementar estos efectos a través de varios mecanismos (Figura 1). Así pues, en los pacientes con hiperinsulinemia, la insulina puede desencadenar proliferación de células malignas a través de la estimulación del sistema de Akt y posterior activación de mTOR. Además, la hiperglucemia puede promover la tumorigénesis por vía directa, ya que las células malignas dependen de glucólisis para obtener su energía[22]



**Figura 1.** Relación entre obesidad, diabetes mellitus y cáncer. Los diferentes factores de riesgo compartidos, como la inflamación, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia llevan al incremento del sustrato del receptor de insulina (del inglés Insulin receptor substrate o IRS), estimulando la fosforilación de Ras incrementa la proliferación celular. Además, en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 hay una alteración en la translocación del transportador GLUT4, que como consecuencia provoca un aumento de la señalización de AKT/mTOR, que puede afectar tanto las vías metabólicas como las mitogénicas.[22]

Las vías de señalización antes mencionadas son en parte reguladas por fosforilación en residuos de tirosina. Las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas de tirosina regulan los niveles de fosforilación en residuos de tirosina. Las cinasas de tirosina adicionan grupos fosfato, mientras que las fosfatasas de tirosina o PTPs defosforilan residuos de fosfotirosina en una gran variedad de sustratos. El balance entre cinasas y fosfatasas determina el estado de fosforilación de los componentes de las vías de señalización[23]. En años recientes, se ha descrito que uno de los principales reguladores de las vías implicadas en la fisiopatología de la obesidad y la diabetes es la fosfatasa de tirosinas PTP1B, la cual contiene 435 aminoácidos con un peso molecular de 50 KDa, pertenece al subtipo no receptor. Los últimos 35 aminoácidos son una secuencia de localización a la cara citoplásmica del retículo endoplásmico, lo cual le sirve como un mecanismo de regulación, limitando su disponibilidad a los sustratos que puede defosforilar[24]. Se ha demostrado que PTP1B es un regulador negativo tanto de la vía de las adiponectinas como del receptor de insulina. En el

caso de la vía de la insulina, PTP1B defosforila al receptor de insulina (IR) y las proteínas IRS, mientras que en la vía de la leptina, defosforila a la cinasa JAK2 (del inglés Janus Kinase 2) que es un elemento río abajo en la señalización de la leptina [23, 25](figura 2). Los ratones knockout para PTP1B presentan resistencia a la obesidad inducida por la dieta alta en carbohidratos y adiposidad reducida por incremento del gasto energético, y son más sensibles a la acción tanto de la leptina como de la insulina[23]. Es por esta razón que se ha propuesto a PTP1B como un blanco terapéutico atractivo para el tratamiento tanto de la diabetes mellitus tipo 2 como de la obesidad, y actualmente se encuentran en desarrollo múltiples inhibidores de esta fosfatasa en fases preclínicas[26].



**Figura 2.** Regulación de las vías metabólicas de leptina e insulina por PTP1B. Existen varias PTPs que pueden regular negativamente las vías de leptina e insulina. PTP1B (señalada con una flecha gruesa) inhibe estas vías defosforilando en la vía de leptina a JAK2 y en la vía de insulina al receptor de insulina y al IRS. También ha sido señalada en la defosforilación de la proteína Tub.[23]

PTP1B tiene un papel importante dentro de la fisiopatología del cáncer, aunque su función no se encuentra del todo clara; existe evidencia de que PTP1B puede actuar como promotor y como supresor de tumores. En el caso del cáncer de mama, existen varios estudios que han asociado a PTP1B con la regulación de la señalización de HER2. Sin embargo, los resultados en cultivos

celulares han dado resultados contradictorios sobre el resultado del efecto de PTP1B sobre todo en la vía de señalización de HER2. En ratones transgénicos que generan tumores HER2 positivos y deficientes en PTP1B, hay retraso en la aparición de tumores[27, 28]. Estos datos indican que PTP1B tiene un papel importante en la señalización de HER2, aunque aún no se conoce el mecanismo de regulación importante y tampoco se sabe muy bien si tiene un papel similar en otros oncogenes y en otros tipos de tumores[25]. Recientemente, se analizaron 1,402 muestras de cáncer de mama en las que PTP1B se expresó en 49% de estas muestras, y se consideró como un factor pronóstico positivo para supervivencia global (Hazard ratio, HR=0.779)[29].

Se ha demostrado que el IGF1R es uno de los receptores importantes relacionados con la transformación de células malignas, así como en la progresión de distintos tipos de tumores. Río debajo de IGF1R, existen múltiples vías que median la proliferación, transformación y supresión de apoptosis, entre ellas MAPKs y AKT. PTP1B se encarga de regular la actividad de IGF1R, defosforilándolo e inactivándolo y, por lo tanto, su señalización río abajo. La pérdida de PTP1B puede favorecer la supervivencia celular mediada por IGF-I. En células COS y en fibroblastos, se ha mostrado que las células deficientes en PTP1B tienen mayor protección a la apoptosis mediada por IGF1, mayor migración y mayor eficiencia para formar colonias [30]. Sin embargo, se conoce poco sobre el papel de PTP1B dentro de los mecanismos moleculares por los cuales actúa la metformina, principalmente en la vía del IGF1R y sus consecuencias biológicas en los tumores. Por lo antes mencionado, en este trabajo se evaluaron los efectos biológicos de la metformina en cultivos primarios de cáncer de mama (citotoxicidad, proliferación, migración) y la combinación de metformina con fármacos utilizados para quimioterapia y su relación con la expresión de PTP1B. Nuestros resultados muestran que las células PTP1B positivas son resistentes al efecto citotóxico de la metformina, no inhibe la proliferación y migración celular que en las células PTP1B negativas. Estos datos sugieren que pacientes con cáncer de mama positivas para PTP1B pudieran no beneficiarse del tratamiento con metformina.

## II. JUSTIFICACIÓN

Existen múltiples mecanismos propuestos para la acción de la metformina en cáncer de mama con resultados contradictorios *in vitro*. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de la metformina con relación a la fosfatasa PTP1B que se sabe regula IGF1R, uno de los potenciales blancos de metformina.

### **III. OBJETIVOS**

#### **a. Objetivo general**

- Evaluar el efecto de la metformina sobre los procesos biológicos y citotoxicidad a fármacos de quimioterapia en cultivos primarios de cáncer de mama PTP1B positivos y negativos.

#### **b. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto citotóxico de la metformina en células de cáncer de mama PTP1B positivas y negativas.
- Evaluar el efecto de la metformina sobre la proliferación celular de células de cáncer de mama PTP1B positivas y negativas.
- Evaluar el efecto de la metformina sobre la migración celular en células de cáncer de mama PTP1B positivas y negativas.
- Evaluar el efecto de la metformina en combinación con fármacos quimioterapéuticos (doxorubicina, paclitaxel, lapatinib) en células PTP1B positivas y negativas.

#### **IV. HIPÓTESIS**

##### **a. Hipótesis nula**

El efecto de la metformina sobre la proliferación, migración celular y citotoxicidad en células de cáncer de mama no depende de la expresión de PTP1B.

##### **b. Hipótesis alterna**

El efecto de la metformina sobre la proliferación, migración celular y citotoxicidad en células de cáncer de mama depende de la expresión de PTP1B.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### a. CULTIVO CELULAR

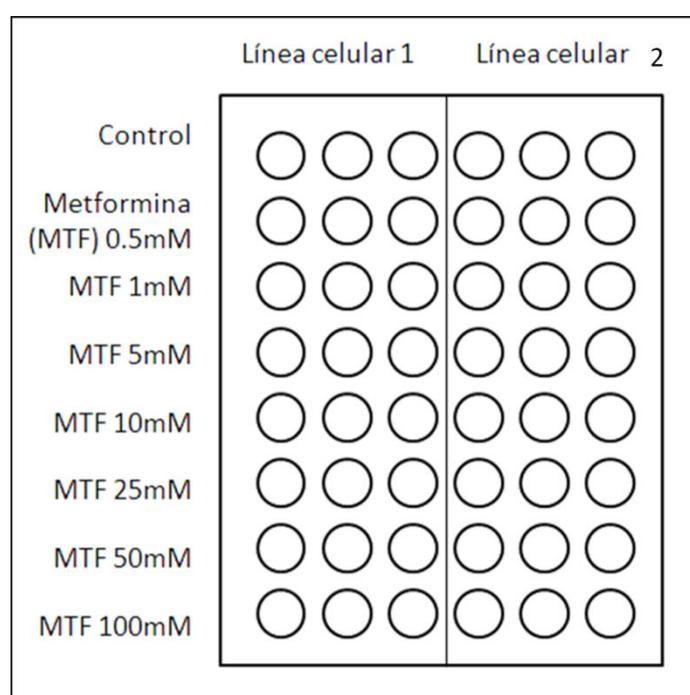
Se utilizaron cultivos primarios obtenidos a partir de biopsias de pacientes con cáncer de mama denominadas MBCDF, MBCD4, MBCD5 y MBCDF-B3 (Protocolo aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, referencia 1549), además de las líneas celulares comerciales MDA-MB-231 (cáncer de mama triple negativo) y SKBR3 (prototipo cáncer de mama HER2 positivo). Las células fueron sembradas en cajas de Petri de 100mm, mantenidas con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se sembraron en cajas de Petri de 60mm de diámetro y se dejaron crecer a un 90% de confluencia, posteriormente se realizaron ensayos de citotoxicidad, proliferación o migración, o bien, se obtuvieron pellets celulares, se congelaron a -70°C y se utilizaron posteriormente para analizar por Western Blot la expresión de receptores.

### b. WESTERN BLOT

Los pellets celulares fueron lisados con 50mM HEPES pH 7.4, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% NP-40, 10mM NaF, 50mM βglicerolfosfato y 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; centrifugados a 13,500rpm por 15 minutos. El sobrenadante se colectó en tubos Eppendorf, posteriormente por el método colorimétrico de Bradford se realizó cuantificación de la cantidad de proteína. Se corrieron cantidades equivalentes de proteína (20μg) en un gel SDS-PAGE, y después se transfirió a una membrana Inmobilon-P PDVF(Millipore) por 1 hora a 100V. Se bloqueó con leche al 5% en PBS-Tween por 45 minutos y posteriormente se incubó con anticuerpos contra: IGF1R, HER2, PTP1B, tubulina (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron lavados con PBS-Tween y se colocó el anticuerpo secundario-HRP (Anti-ratón o anti-conejo) correspondiente, el cual se incubó por 1 hora. Se realizó nuevamente lavado con PBS-Tween y se reveló con el agente de quimioluminiscencia ECL Plus en una placa radiográfica (Kodak)

### c. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON METFORMINA

En los ensayos de citotoxicidad se sembraron 15,000 células/cm<sup>2</sup> en una placa de 48 pozos. A las 24 horas se les agregó metformina a concentraciones crecientes (0.5mM, 1mM, 5mM, 10mM, 25mM, 50mM, 100mM), la cual se dejó por 48 horas. Posteriormente, se retiró el medio con el tratamiento establecido y las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% por 20 minutos y fueron teñidas con 200µl de cristal violeta. Se disolvió el colorante con 400µl de ácido acético al 10%, se colocó en placas de ELISA y se leyó la absorbancia a 570nm. Cada ensayo fue realizado por triplicado y al menos 3 veces de manera independiente (figura 3).

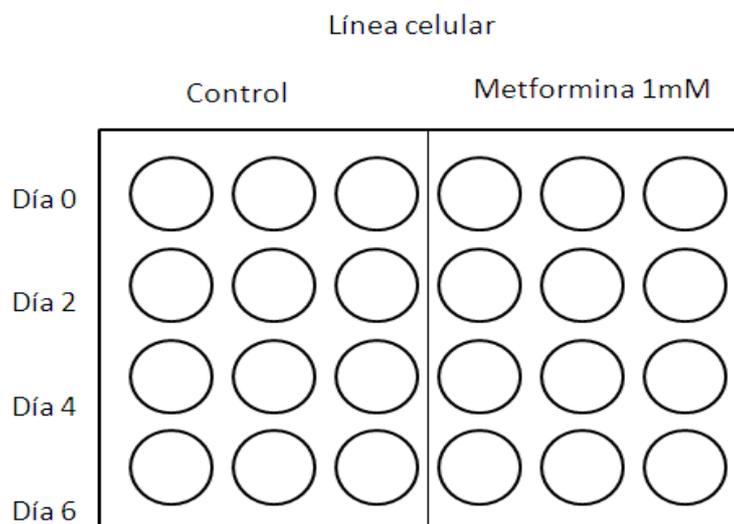


**Figura 3.** Esquema del ensayo de citotoxicidad de metformina en placas de 48 pozos. Se sembraron 15,000 células/cm<sup>2</sup> en placa de 48 pozos. A las 24 horas se les agregó metformina a concentraciones crecientes (0.5mM, 1mM, 5mM, 10mM, 25mM, 50mM, 100mM) por 48 horas. Se retiró el medio y las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% por 20 minutos y teñidas con 200µl de cristal violeta. El colorante se disolvió con 400µl de ácido acético al 10%, se colocó en placas de ELISA y se leyó la absorbancia a 570nm. Cada ensayo fue realizado por triplicado y al menos 3 veces de manera independiente

### d. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación se evaluó sembrando 7,500 células/cm<sup>2</sup> en una placa de 24 pozos. A las 24 horas se les agregó metformina 1mM a la mitad de los pozos (se consideró este el día 0) y posteriormente a los 0,2, 4 y 6 días se agregaron 40µl de MTT, el cual se retiró a las 2 horas. Al término de los 6 días,

se realizó dilución del MTT con 200µl de PBS y 200µl de isopropanol acidulado (0.1N HCl) por pozo, por 20 minutos. Se colocó en placas de ELISA y se realizó lectura en lector de microplaca con el programa Revelation Quicklink a 570 y 630nm. Cada ensayo fue realizado por triplicado, al menos 3 veces de manera independiente (figura 4)



**Figura 4.** Esquema del ensayo de proliferación celular en placas de 24 pozos. Se sembraron 7,500 células/cm<sup>2</sup> en una placa de 24 pozos. A las 24 horas se les agregó metformina 1mM a la mitad de la placa (día 0) y a los días 0, 2, 4 y 6 se agregaron 40µl de MTT, y se retiró a las 2 horas. Al término de los 6 días, se diluyó el MTT con 200µl de PBS y 200µl de isopropanol acidulado (0.1N HCl) por pozo, por 20 minutos. Se colocó en placas de ELISA y se leyó en lector de microplaca a 570 y 630nm. Cada ensayo se realizó por triplicado, 3 veces de manera independiente.

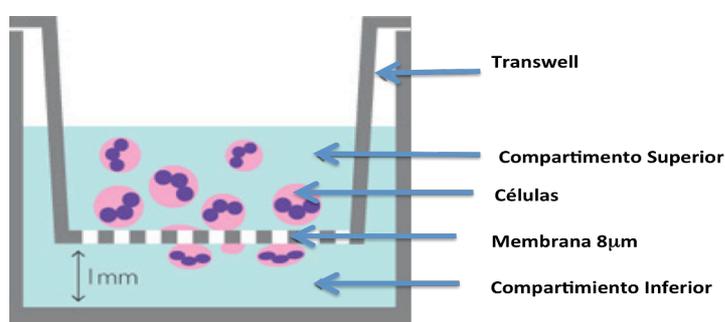
#### e. ENSAYOS DE MIGRACIÓN: HERIDA EN MONOCAPA

Se sembraron 600,000 células en placas de 6 pozos, a las 24 horas cuando se obtuvo 90-95% de confluencia se realizó herida en la monocapa con una punta de pipeta estéril en varias ocasiones. Las células fueron reincubadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, a la mitad de los pozos se les agregó metformina 1mM (se consideró esta la hora 0) y posteriormente a las 24 horas se evaluó la migración celular hacia la herida y se tomaron fotografías.

#### f. ENSAYOS DE MIGRACIÓN: CÁMARA DE BOYDEN.

Con el objetivo de cuantificar la migración, se sembraron 100,000 células/cm<sup>2</sup> utilizando cámaras de Boyden en placas de 24 pozos, con medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al

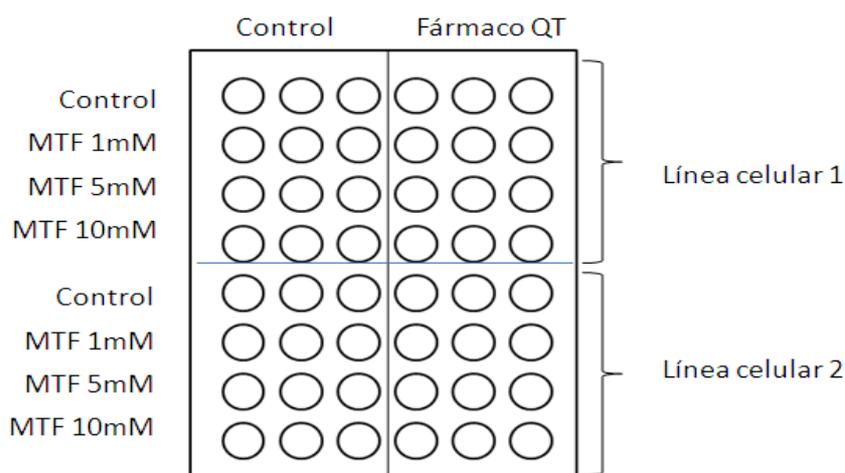
10% y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> por 6 horas, a la mitad de ellas se les colocó metformina 1mM. Posteriormente, se aspiró gentilmente el contenido de cada cámara y se limpió con hisopos de algodón para remover excedente. Se fijaron con glutaraldehído al 1.1% por 20 minutos y posteriormente se tiñeron con cristal violeta. Una vez secas, se visualizaron en el microscopio a un aumento de 20X, escogiendo 5 campos aleatorios, se realizó un recuento de las células teñidas por cada campo y se obtuvo el promedio de cada cámara. Se multiplicó el promedio por la constante de visualización del campo del microscopio (0.01) y después por el área de la membrana (0.33cm<sup>2</sup>) y se dividió entre el número de células sembradas en 1cm<sup>2</sup>, y se multiplicó por 100 para obtener un porcentaje de migración. (Figura 5)



**Figura 5.** Representación gráfica del ensayo de migración con cámara de Boyden.

#### **g. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DE METFORMINA COMBINADA CON FARMACOS DE QUIMIOTERAPIA**

Se sembraron 15,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 48 pozos. A las 24 horas se les agregó metformina a concentraciones crecientes (1mM, 5mM, 10mM) y a las 2 horas a la mitad de los pozos se les agregó un fármaco citotóxico a una sola concentración (doxorrubicina 0.1µg/ml, lapatinib 0.5µM o paclitaxel 0.5µg/ml), la cual se dejó por 48 horas. Posteriormente, se retiró el medio con el tratamiento establecido y las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% por 20 minutos y fueron teñidas con 200µl de cristal violeta. Se disolvió el colorante con 400µl de ácido acético al 10%, se colocó en placas de ELISA y se leyó la absorbancia a 570nm. Cada ensayo fue realizado por triplicado y al menos 3 veces de manera independiente (Figura 6)



**Figura 6.** Representación gráfica de los ensayos de citotoxicidad de combinaciones de metformina con quimioterapia. Se sembraron 15,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 48 pozos. A las 24 horas se les agregó metformina a concentraciones crecientes (1mM, 5mM, 10mM) y a las 2 horas a la mitad de los pozos se les agregó un fármaco citotóxico a una sola concentración (doxorrubicina 0.1µg/ml, lapatinib 0.5µM o paclitaxel 0.5µg/ml), por 48 horas. Se retiró el medio y las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% por 20 minutos y se tiñieron con 200µl de cristal violeta. Se disolvió el colorante con 400µl de ácido acético al 10%, se colocó en placas de ELISA y se leyó la absorbancia a 570nm. Cada ensayo fue realizado por triplicado y por 3 veces de manera independiente

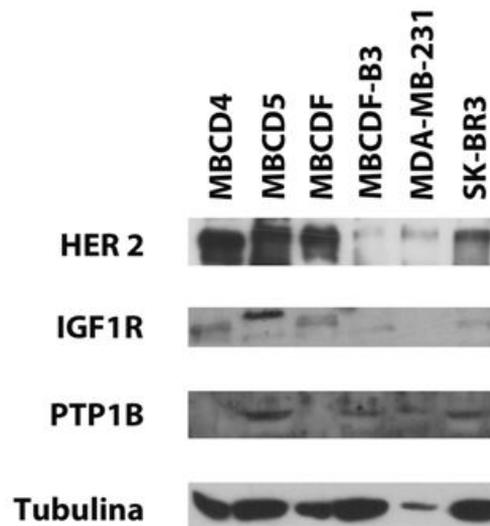
#### h. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de evaluar diferencias entre las distintas líneas celulares, se realizó análisis estadístico con el software SPSS versión 20.0 para PC (Chicago, Ill). Se realizó prueba de ANOVA o t de Student para comparar la citotoxicidad entre células PTP1B positivas y negativas, se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor a 0.05. Se calcularon los IC<sub>50</sub> para cada línea celular a partir de los modelos descritos por Chou [24]. Para comparar la proliferación entre células PTP1B positivas y negativas se utilizó prueba de Kruskal-Wallis.

## VI. RESULTADOS

### a. Expresión de PTP1B, HER2 e IGF1R en los cultivos primarios y líneas celulares de cáncer de mama.

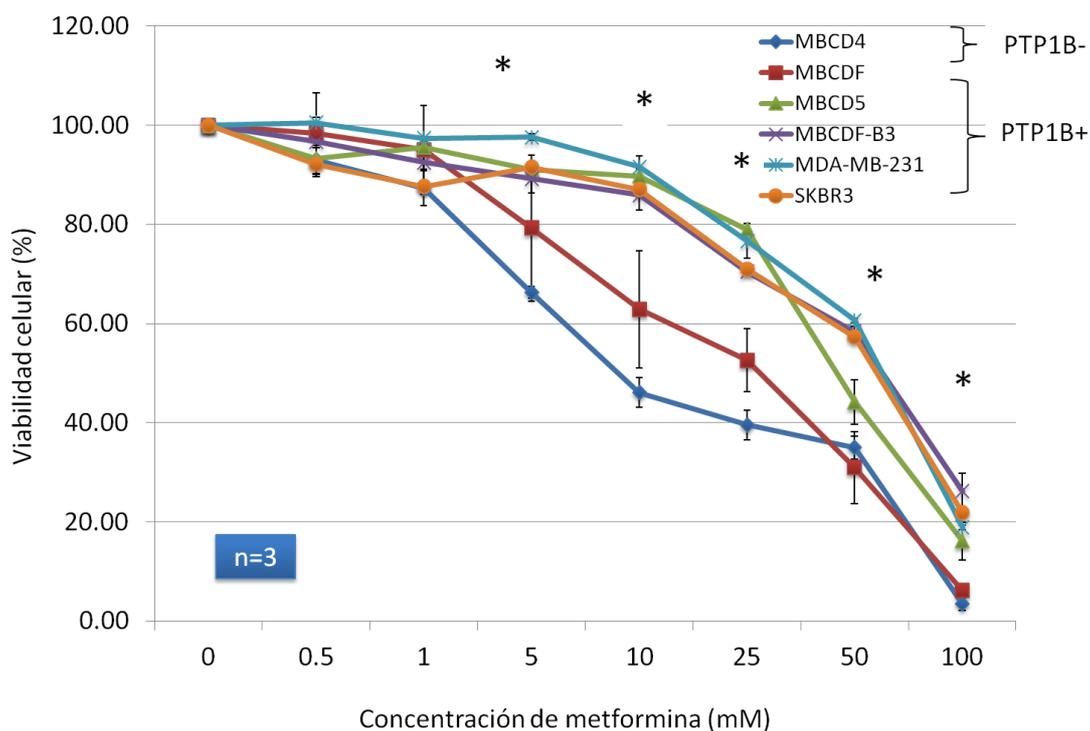
Para caracterizar los cultivos utilizados, se realizaron Western Blots para evaluar la expresión de PTP1B, HER2 e IGF1R. Se encontró que las líneas derivadas de los cultivos primarios MBCDF y MBCD4 son negativas para la expresión de PTP1B, mientras que las líneas MBCD5 y MBCDF-B3 son positivas para la expresión de PTP1B. Así mismo, todos estos cultivos expresan HER2 e IGF1R de manera similar. Las líneas comerciales MDA-MB-231 y SKBR3 son positivas para PTP1B (figura 7).



**Figura 7.** Expresión de HER2, IGF1R, PTP1B en cultivos primarios y líneas celulares de cáncer de mama. Se corrieron veinte microgramos de proteína en un gel SDS-PAGE. Se realizaron Western Blots para analizar la expresión de Her2, IGF1R, PTP1B y tubulina como control de carga. PTP1B se encuentra presente en las líneas MBCD5, MBCDF-B3, MDA-MB-231 y SKBR3

**b. Las células de cáncer de mama PTP1B positivas son resistentes al tratamiento con metformina.**

Para evaluar los efectos de la metformina sobre células primarias de cáncer de mama, se realizaron ensayos de citotoxicidad adicionando concentraciones crecientes de metformina. Los resultados muestran que las células PTP1B positivas (MBCDF-B3, MBCD5) fueron resistentes al tratamiento con metformina, incluso a concentraciones elevadas como 50mM, donde se observa una viabilidad de aproximadamente el 50%, mientras que las células PTP1B negativas (MBCD4, MBCDF) tienen menor viabilidad desde concentraciones bajas. No se observan diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones de 0.5 y 1mM. Al incrementar las concentraciones se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos celulares a partir de 5mM hasta 100mM (Figura 8). La IC<sub>50</sub> para las células PTP1B negativas osciló entre 9-16mM, mientras que para las células PTP1B positivas es de 50-68mM (Tabla 1). Estos datos muestran que las células PTP1B positivas son resistentes al efecto de la metformina.



**Figura 8.** Efecto citotóxico de metformina en cultivos primarios y líneas celulares de cáncer de mama. Las líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama se sembraron en placas de 48 pozos y se trataron con concentraciones crecientes de metformina (0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100mM). La viabilidad celular se evaluó después de 48 horas de adicionar la metformina por el ensayo de cristal violeta. Cada punto representa la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes sembrados en triplicado (\* $p < 0.05$  PTP1B positivas versus PTP1B negativas).

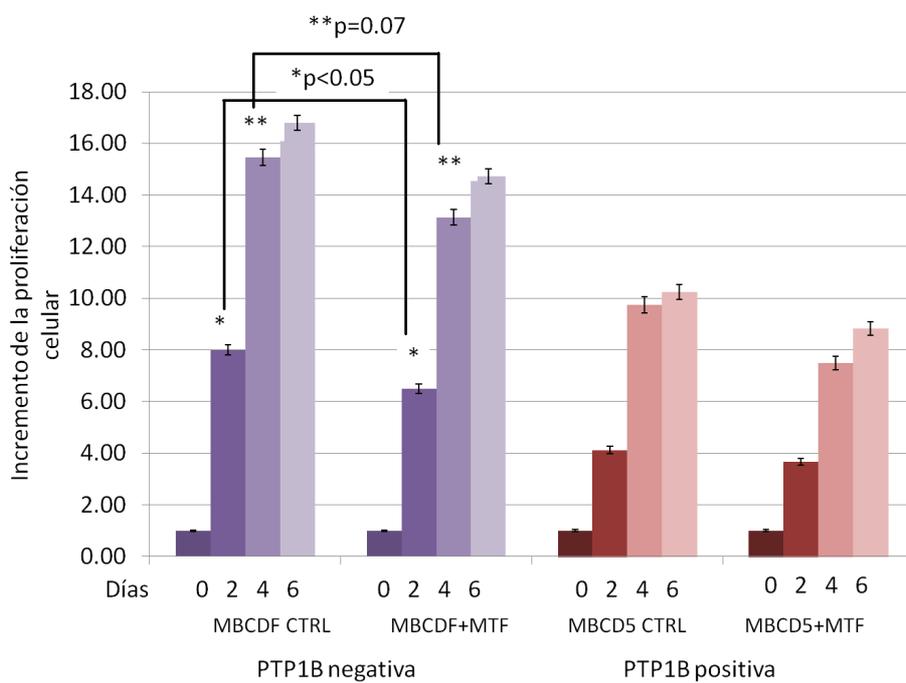
Línea celular	IC50 Metformina (mM)
MBCD4	9.35
MBCDF	16.89
MBCD5	50.73
MDA-MB-231	53.21
MBCDF-B3	61.39
SKBR3	68.11

**Tabla 1.** IC<sub>50</sub> para las distintas líneas celulares.

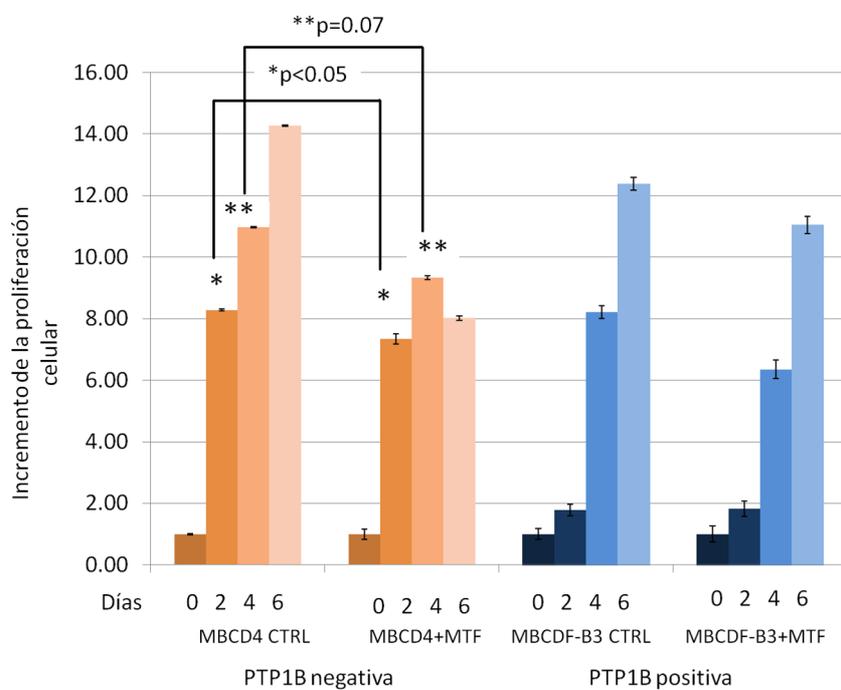
**c. Efecto de la metformina en la proliferación celular.**

En los ensayos de citotoxicidad se observó que las células PTP1B positivas son resistentes a la metformina en comparación a las células PTP1B negativas. Para analizar su efecto sobre la proliferación celular, se realizaron ensayos de proliferación. Se puede observar que aunque las células PTP1B negativas proliferan más que las positivas, al agregar metformina se observa una mayor disminución de la proliferación celular con respecto a los controles comparado con las células PTP1B tratadas con metformina donde se observa poco efecto (figura 9). La diferencia en las células PTP1B positivas y negativas que reciben metformina son estadísticamente significativas al día 2 ( $p=0.015$ ) y tendencia a la significancia estadística en el día 4 ( $p=0.073$ ); esta diferencia se pierde al día 6. Los resultados demuestran que al añadir metformina las células PTP1B negativas reducen su tasa de proliferación con respecto a sus controles, principalmente en los primeros 4 días.

(A)



(B)

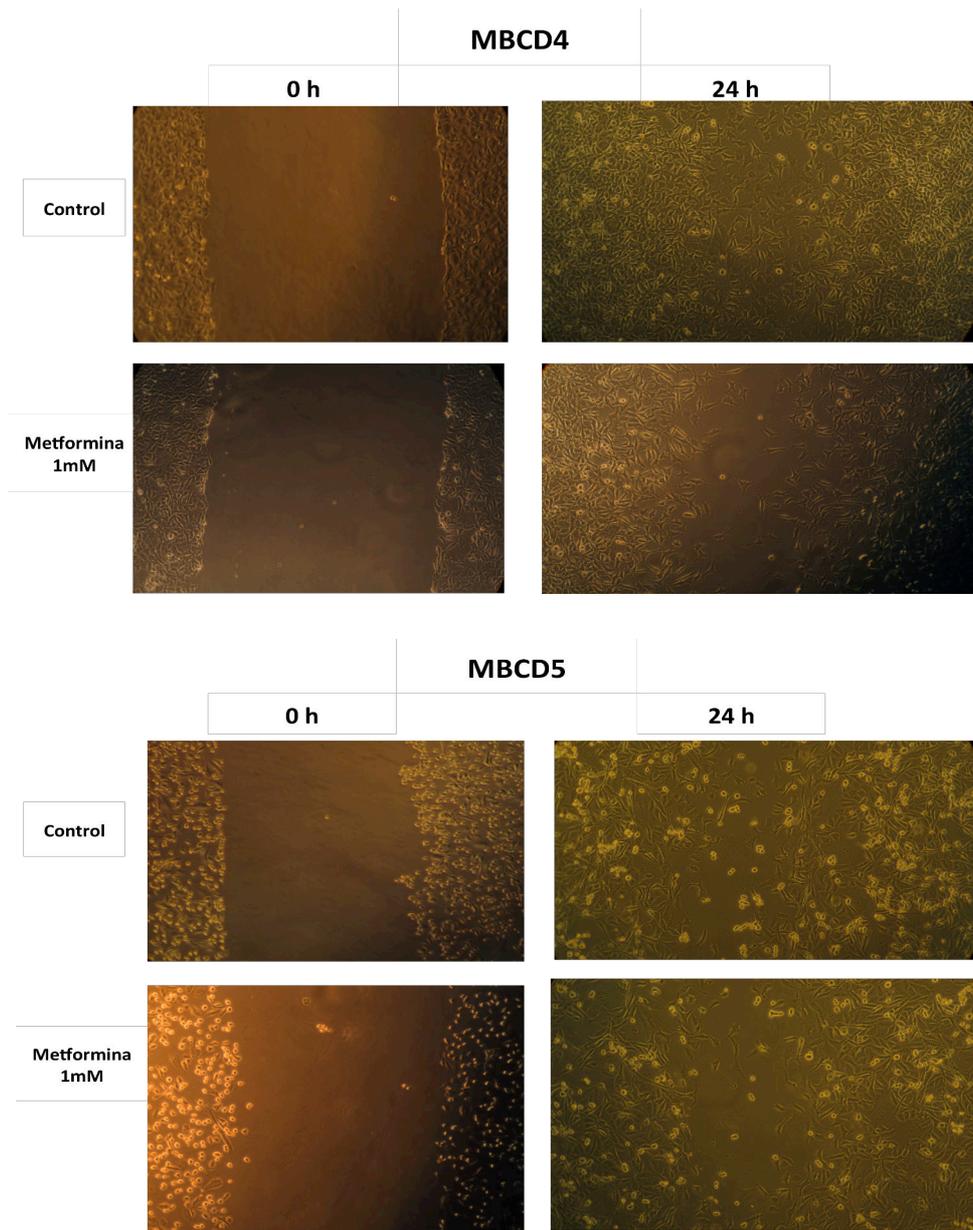


**Figura 9.** Ensayo de proliferación celular. Los cultivos primarios de cáncer de mama se sembraron en placas de 24 pozos, a la mitad de los pozos se les agregó 1mM metformina. La proliferación celular se evaluó a los días 0, 2, 4 y 6 días por el método de reducción de MTT. Cada barra representa la media  $\pm$  SE del incremento de la proliferación en

tres experimentos independientes. (\*p=0.015,\*\*p=0.07 de las células tratadas con metformina versus las células control)

**d. Las células PTP1B negativas tienen menor capacidad de migración con metformina.**

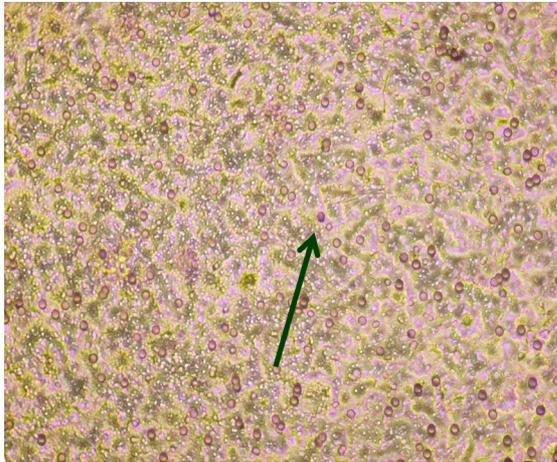
En los resultados previos, la metformina parece solo tener un efecto significativo sobre las células PTP1B negativas; por lo cual, se procedió a realizar ensayos de migración celular cualitativa y cuantitativa. Inicialmente, se realizaron ensayos de herida en monocapa, eligiendo las líneas celulares con mayor capacidad de migración (MBCD4 –PTP1B negativa- y MBCD5 –PTP1B positiva). Se puede observar que en la línea celular MBCD4 las células tratadas con metformina no alcanzan a cerrar completamente hacia la herida realizada en la monocapa a diferencia de los controles, mientras que en las células PTP1B positivas no se observa diferencias entre los controles y las tratadas con metformina a las 24 horas, donde se observa que en ambos lados de la herida no se alcanza a cerrar (figura 10). Para realizar cuantificación de la migración se sembraron ambos cultivos primarios en cámaras de Boyden a la mitad de ellas se les agregó 1mM metformina. El cultivo MBCD4 mostró diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con metformina, con disminución de la migración; mientras que las células MBCD5 mostraron un aumento estadísticamente significativo en la migración en las células tratadas con metformina (figura 11). Los resultados de ambos experimentos demuestran que las células PTP1B negativas tienen menor migración al recibir tratamiento con metformina y las células PTP1B positivas muestran mayor migración al agregar metformina.



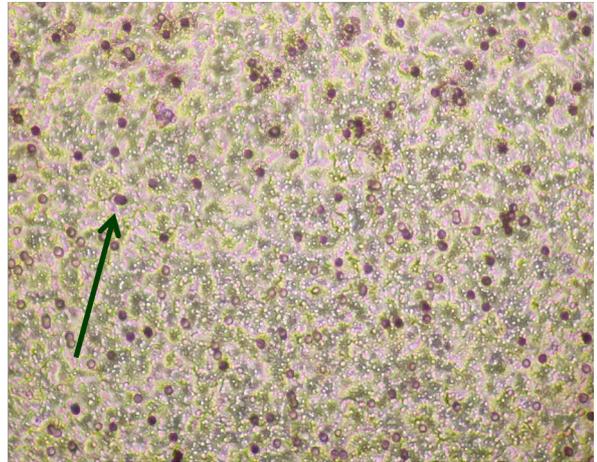
**Figura 10.** Ensayos de migración por herida en monocapa. Se sembraron los cultivos MBCD4 y MBCD5 en una placa de 6 pozos y al lograr confluencia del 90% se realizó una herida en monocapa con una punta estéril de pipeta, a la mitad de ellos se agregó metformina 1mM y se tomaron fotografías al tiempo 0 y a las 24 horas. Estas fotografías fueron tomadas a un aumento 10X y cada una es representativa de múltiples campos similares.

(A)

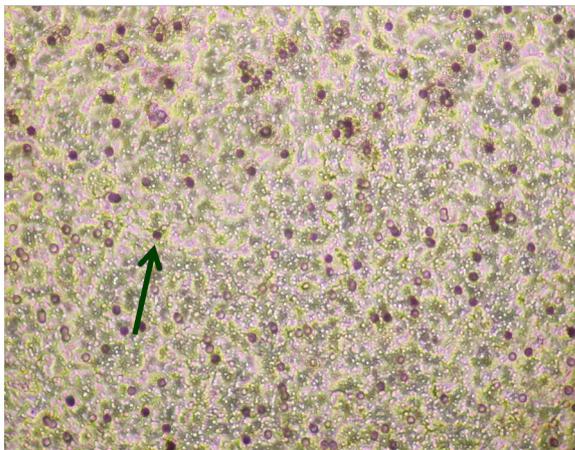
**MBCD4 CONTROL**  
**6 h**



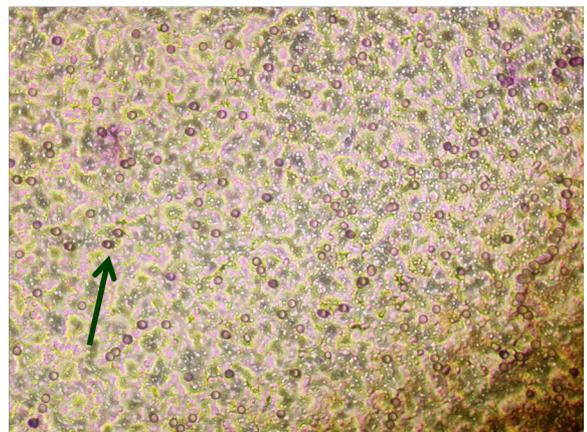
**MBCD4 + MTF 1mM**  
**6 h**



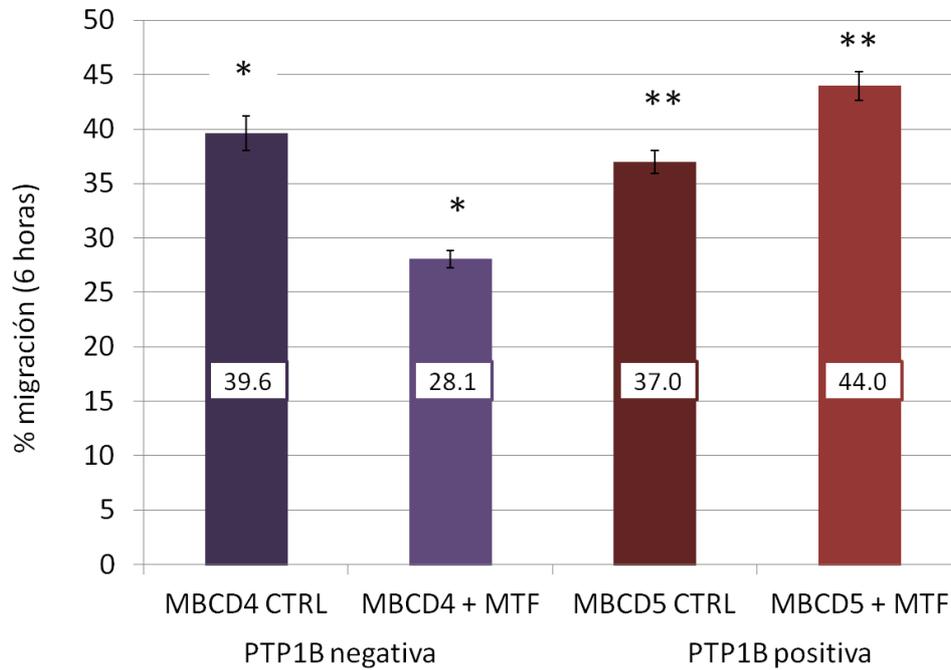
**MBCD5 CONTROL**  
**6 h**



**MBCD5 + MTF 1mM**  
**6 h**



(B)



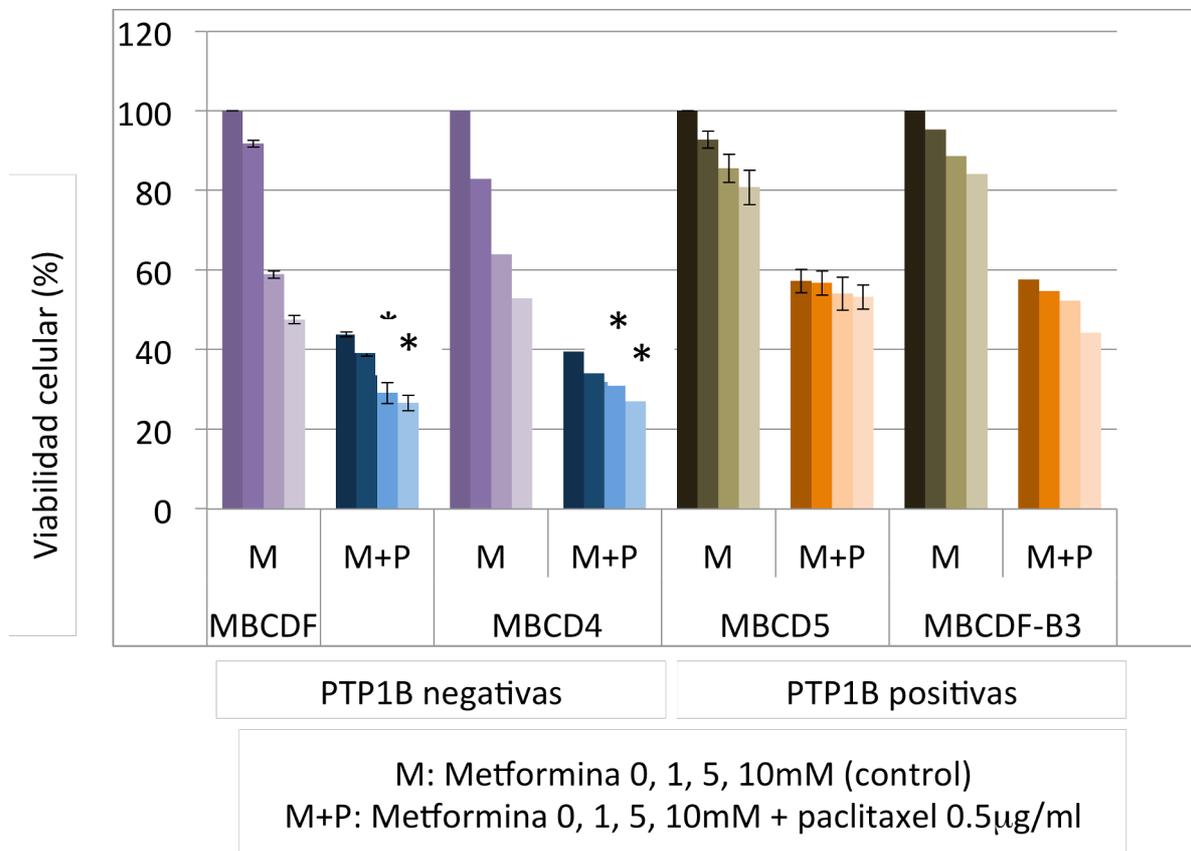
**Figura 11.** Ensayos de cuantificación de migración por cámara de Boyden. Se sembraron 100,000 células/cm<sup>2</sup> de los cultivos primarios MBCD4 y MBCD5 en cámaras de Boyden, a la mitad de ellas se agregó 1mM de metformina y se evaluó la migración a las 6 horas mediante conteo de cinco campos aleatorios. Se graficó el porcentaje de migración, cada gráfica representa la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes (\* $p < 0.003$ , \*\* $p < 0.017$  grupo control versus tratado con metformina)

**e. La metformina tiene un efecto aditivo con paclitaxel y doxorrubicina en las células PTP1B negativas.**

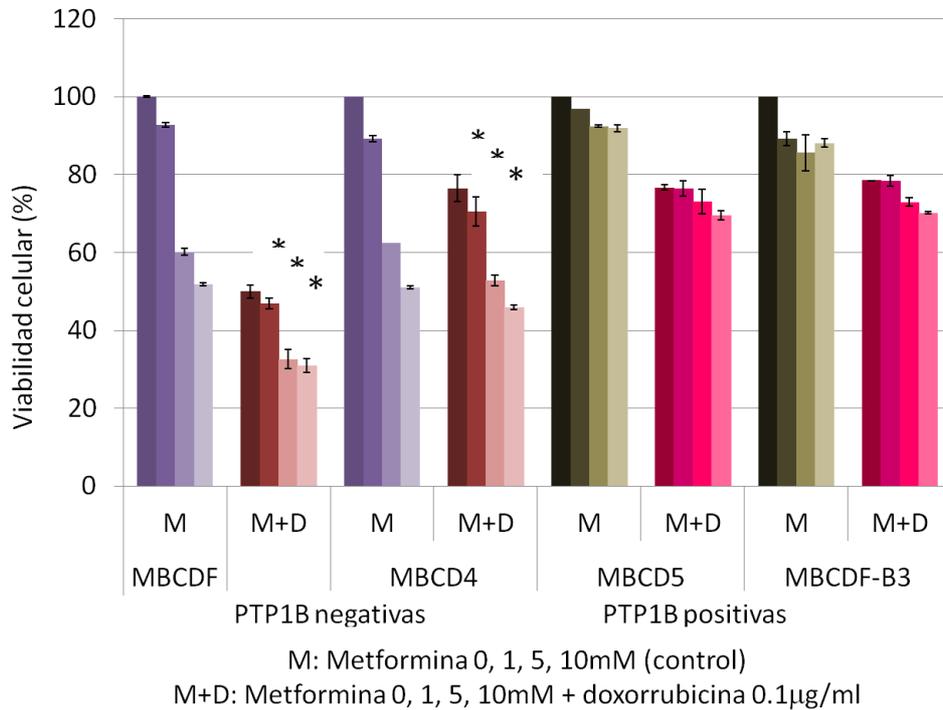
El siguiente objetivo fue evaluar el efecto al combinarla con fármacos de uso habitual para quimioterapia en cáncer de mama. Para dichos experimentos se sembraron los cultivos primarios (MBCDF, MBCD4, MBCD5, MBCD5-B3) en placas de 48 pozos, a todos ellos se les puso metformina a 3 concentraciones (1, 5, 10mM) por 2 horas y posteriormente, se agregó el fármaco de quimioterapia, ya sea un antraciclino (doxorrubicina), un taxano (paclitaxel) o una terapia anti HER2 (lapatinib). Se observó que en las células PTP1B negativas, tanto el paclitaxel (figura 12A) como la doxorrubicina (figura 12B) tuvieron un efecto aditivo al añadir metformina, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre las células tratadas solo con el fármaco

quimioterapéutico contra la combinación ( $p < 0.05$ ), mientras que en las células PTP1B positivas no existió diferencia al combinar metformina con los fármacos quimioterapéuticos. En el caso de lapatinib (figura 12C) en ambos grupos no existieron diferencias al añadir metformina. Para el caso de paclitaxel y doxorubicina, el índice de combinación resultó aditivo para ambos fármacos, mientras que para lapatinib fue antagónico. Estos resultados sugieren que la adición de metformina a paclitaxel y doxorubicina tiene un efecto aditivo en la citotoxicidad en las células PTP1B negativas. Por lo tanto, la combinación de metformina con paclitaxel y doxorubicina podría ser solo eficiente en pacientes con tumores PTP1B negativos.

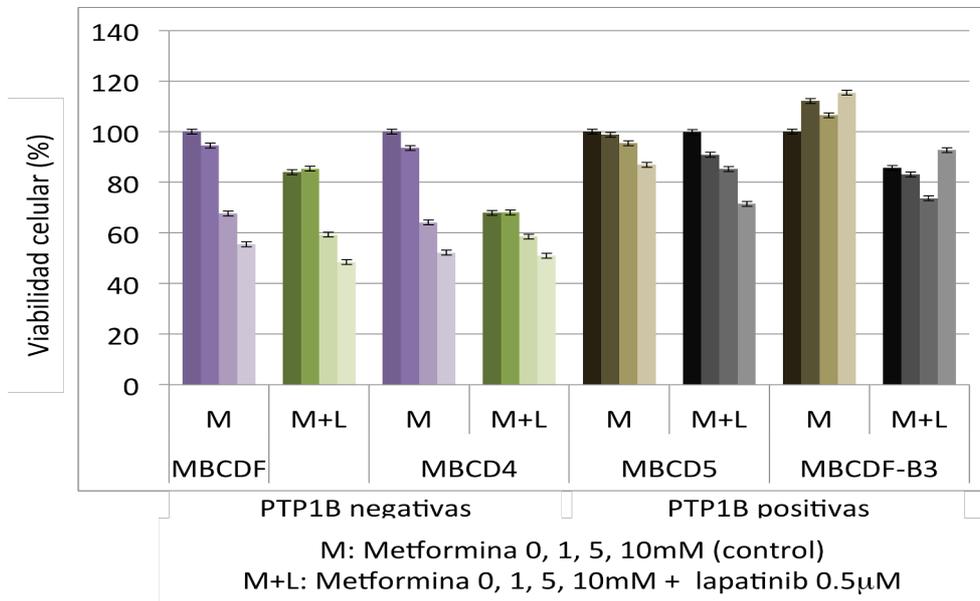
(A)



(B)



(C)



**Figura 12.** Citotoxicidad de metformina en combinación con otros fármacos de quimioterapia en cultivos celulares de cáncer de mama. Los cultivos primarios de cáncer de mama (MBCDF, MBCD4, MBCD5, MBCD5-B3) se sembraron en placas de 48 pozos a una densidad de 7,500 células/cm<sup>2</sup>, se trataron con concentraciones crecientes de metformina (1, 5, 10mM). A las 2 horas se agregó uno de los siguientes fármacos: (A) paclitaxel 0.5µg/, (B) doxorubicina 0.1µg/ml o (C) lapatinib 0.5µM. La viabilidad celular se evaluó después de 48 horas de adicionar ambos fármacos por el ensayo de cristal violeta. Cada punto representa la media ± SE de tres experimentos independientes sembrados en triplicado (\*p<0.05 células tratadas con el fármaco quimioterapéutico versus la combinación de ambos fármacos).

## VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo estudiamos el efecto de la metformina sobre la viabilidad, proliferación y migración de células de cáncer de mama y combinación con otros fármacos de quimioterapia en relación a la expresión de PTP1B. Demostramos que en las células que no tienen PTP1B son más susceptibles a la metformina, disminuyen su proliferación y migración celular, comparado con las células PTP1B positivas, en donde no se observa efecto sobre estos procesos biológicos. Se ha propuesto que la metformina puede disminuir la incidencia de cáncer y una mortalidad de estos pacientes[14]. Sin embargo, nunca se había estudiado su relación con la expresión de PTP1B; y nuestros resultados sugieren que la metformina no sería benéfica en todas las pacientes con cáncer de mama, específicamente las que expresen la fosfatasa PTP1B.

La  $IC_{50}$  de las células PTP1B positivas se encontró a concentraciones de metformina entre 50-60mM, mientras las células PTP1B negativas requirieron concentraciones más bajas. Esto es relevante, ya que se ha observado que las concentraciones séricas de metformina en pacientes diabéticos es aproximadamente 50 $\mu$ M [32], aunque se ha demostrado que las concentraciones alcanzadas a nivel tisular son mayores, llegando a ser entre 1-10mM [33]. Los ensayos de proliferación, migración y combinaciones de fármacos se realizaron con concentraciones de metformina que aún se consideran fisiológicas (1-10mM) y en todos encontramos diferencias en el grupo de cultivos PTP1B negativos. Esto fortalece la idea de que aún a concentraciones fisiológicas podemos obtener efectos en el grupo de pacientes sin expresión de PTP1B, mientras que en los pacientes PTP1B positivos no se obtendría ningún efecto con concentraciones de metformina que se consideran fisiológicas, por lo tanto, no sería recomendable el tratamiento con metformina.

Existen varios estudios que han investigado el papel de la metformina en distintas líneas celulares comerciales, estos estudios han demostrado inhibición del crecimiento en líneas celulares de cáncer de mama como MCF-7, MDA-MB-231 y SKBR3. En todos estos estudios se requirieron concentraciones mayores a 1mM para obtener un efecto sobre la proliferación. Sadighi y cols. investigaron el efecto de la metformina y la combinación con paclitaxel en distintas líneas celulares en condiciones normoglucémicas, sin encontrar efecto citotóxico tanto de la metformina como de la combinación con paclitaxel, utilizando medio con baja suplementación en glucosa [34]. Se ha cuestionado por algunos autores que el hecho de utilizar suplementación elevada de glucosa puede interferir con el resultado obtenido, ya que el efecto antitumoral es secundario a reducción del

efecto mitogénico inducido por la glucosa. Sin embargo, Liu y colaboradores, encontraron que en células de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 la metformina reduce la proliferación y la formación de tumores en ratones con niveles normales de glucosa e insulina[35]. Es importante mencionar que en nuestro estudio, se utilizó medio con concentraciones de glucosa que se consideran en el rango de hiperglucemia (11mM), sin considerarse aún concentraciones suprafisiológicas (equivalente aproximado a 200mg/dl).

El efecto antitumoral de la metformina se ha atribuido a varios mecanismos: activación de la vía de LKB1/AMPK, inducción de apoptosis, inhibición de síntesis proteica y reducción en los niveles circulantes de insulina.[14] Sin embargo, se han postulado otros mecanismos independientes de AMPK; por ejemplo, en células de cáncer pulmonar, se ha demostrado que la metformina produce disminución en la fosforilación de IGF1R, AKT y mTOR, llevando como consecuencia a una inhibición indirecta de mTOR al disminuir la activación del IGF1R [36]. Por otra parte, en varios estudios, tanto en fibroblastos como en células de cáncer de ovario, la PTP1B tiene un papel importante en la vía del IGF1R regulando al receptor a través de su defosforilación[30, 37]. Existen estudios que demuestran que la ausencia de PTP1B aumenta la proliferación, migración, invasión y supervivencia. Si bien no se conoce el mecanismo por el cual la presencia de PTP1B puede afectar la respuesta a la metformina, en las células negativas a PTP1B, la metformina puede estar disminuyendo la proliferación, migración y viabilidad a través de la defosforilación de IGF1R, teniendo como consecuencia disminución de la señalización, mientras que en las células PTP1B positivas, la vía del IGF1R este apagada y probablemente el efecto de la metformina no sea tan notable porque en estas células la proliferación y supervivencia dependan de otras vías como la de HER2, ya que se ha mostrado que se requiere la presencia de PTP1B para la inducción de tumores HER2 positivos[27] y que la señalización cruzada de estas vías (HER2/IGF1R) es importante para el desarrollo de tumores y la resistencia a fármacos como trastuzumab [38]. Es importante ampliar nuestra investigación hacia los posibles mecanismos implicados y hacia el papel que tiene PTP1B dentro de los mecanismos de acción descritos de la metformina. No obstante, nuestros resultados plantean a la PTP1B como un marcador predictivo de respuesta a metformina, siendo solo los pacientes que no expresan PTP1B los que probablemente se beneficien de este tratamiento, lo cual requiere ser comprobado en ensayos clínicos.

Otro punto a destacar de nuestro trabajo es la utilización de cultivos primarios. Se sabe que las líneas comerciales que se utilizan para la investigación preclínica son derivadas de líquido pleural o

de ascitis[39]. De hecho, algunos autores han planteado que los efectos negativos de la metformina son consecuencia de que las líneas celulares, como la MDA-MB-435 (línea de cáncer de mama triple negativa) que en realidad son derivadas de un melanoma[33]. Nuestro estudio utiliza líneas comerciales como controles y cultivos primarios, observando un resultado similar en la citotoxicidad de la metformina de acuerdo a la expresión de PTP1B, lo cual fortalece nuestros resultados, ya que el uso de cultivos primarios puede ser un mejor reflejo de lo que sucede *in vivo*.

En conclusión, en el presente trabajo hemos demostrado que las células que expresan PTP1B son resistentes al efecto citotóxico de la metformina, así como a la inhibición de la proliferación y la migración, a diferencia de las células que no expresan PTP1B. Además, el uso de metformina en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos parece ser eficiente solo en las células que no expresan PTP1B. Estos datos plantean que PTP1B puede tener un papel dentro de los mecanismos de acción de la metformina y que las pacientes con cáncer de mama con positividad para PTP1B pudieran no beneficiarse de este tratamiento, esto requiere confirmación en ensayos clínicos posteriores.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Chavarri-Guerra, Y., et al., *Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(8): p. e335-43.
2. Abdulkareem, I.H., *Aetio-pathogenesis of breast cancer*. *Niger Med J*, 2013. **54**(6): p. 371-5.
3. Yasui, Y. and J.D. Potter, *The shape of age-incidence curves of female breast cancer by hormone-receptor status*. *Cancer Causes Control*, 1999. **10**(5): p. 431-7.
4. Ban, K.A. and C.V. Godellas, *Epidemiology of breast cancer*. *Surg Oncol Clin N Am*, 2014. **23**(3): p. 409-22.
5. Russo, J., et al., *The protective role of pregnancy in breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(3): p. 131-42.
6. República, G.d.l., *Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes*, 2013: México.
7. Polednak, A.P., *Estimating the number of U.S. incident cancers attributable to obesity and the impact on temporal trends in incidence rates for obesity-related cancers*. *Cancer Detect Prev*, 2008. **32**(3): p. 190-9.
8. Arce-Salinas, C., et al., *Overweight and obesity as poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **146**(1): p. 183-8.
9. Chan, D.S., et al., *Body mass index and survival in women with breast cancer-systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies*. *Ann Oncol*, 2014.
10. Scheen, A.J. and L.F. Van Gaal, *Combating the dual burden: therapeutic targeting of common pathways in obesity and type 2 diabetes*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014.
11. He, X., *Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer*. 2012. **23**.
12. Boyle, P., et al., *Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis*. *Br J Cancer*, 2012. **107**(9): p. 1608-17.
13. Noto, H., et al., *Latest insights into the risk of cancer in diabetes*. *J Diabetes Investig*, 2013. **4**(3): p. 225-32.
14. Kourelis, T.V. and R.D. Siegel, *Metformin and cancer: new applications for an old drug*. *Med Oncol*, 2012. **29**(2): p. 1314-27.
15. Evans, J.M., et al., *Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients*. *BMJ*, 2005. **330**(7503): p. 1304-5.
16. Decensi, A., et al., *Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010. **3**(11): p. 1451-61.
17. Bayraktar, S., et al., *Effect of metformin on survival outcomes in diabetic patients with triple receptor-negative breast cancer*. *Cancer*, 2012. **118**(5): p. 1202-11.
18. Leone, A., et al., *New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent*. *Cancer Treat Res*, 2014. **159**: p. 355-76.
19. Hadad, S.M., V. Appleyard, and A.M. Thompson, *Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ERalpha negative MDA-MB-435 breast cancer model*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **114**(2): p. 391.
20. Stambolic, V., et al., *Utility of metformin in breast cancer treatment, is neoangiogenesis a risk factor?* *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **114**(2): p. 387-9.
21. Wu, N., H.J. Gu, and Q. Li, *Effects of antidiabetic drug metformin on the migration and invasion abilities of human pulmonary adenocarcinoma A549 cell line in vitro*. *J Thorac Dis*, 2010. **2**(2): p. 76-80.
22. Sun, G. and S.R. Kashyap, *Cancer risk in type 2 diabetes mellitus: metabolic links and therapeutic considerations*. *J Nutr Metab*, 2011. **2011**: p. 708183.
23. Tsou, R.C. and K.K. Bence, *Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases*. *Front Neurosci*, 2012. **6**: p. 192.

24. Lessard, L., M. Stuiblé, and M.L. Tremblay, *The two faces of PTP1B in cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1804**(3): p. 613-9.
25. Yip, S.C., S. Saha, and J. Chernoff, *PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(8): p. 442-9.
26. Zhang, S. and Z.Y. Zhang, *PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery*. *Drug Discov Today*, 2007. **12**(9-10): p. 373-81.
27. Bentires-Alj, M. and B.G. Neel, *Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(6): p. 2420-4.
28. Julien, S.G., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis*. *Nat Genet*, 2007. **39**(3): p. 338-46.
29. Soysal, S., et al., *PTP1B expression is an independent positive prognostic factor in human breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **137**(2): p. 637-44.
30. Buckley, D.A., et al., *Regulation of insulin-like growth factor type I (IGF-I) receptor kinase activity by protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) and enhanced IGF-I-mediated suppression of apoptosis and motility in PTP-1B-deficient fibroblasts*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(7): p. 1998-2010.
31. Chou, T.C., *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method*. *Cancer Res*, 2010. **70**(2): p. 440-6.
32. Wilcock, C. and C.J. Bailey, *Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse*. *Xenobiotica*, 1994. **24**(1): p. 49-57.
33. Martin-Castillo, B., et al., *Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(6): p. 1057-64.
34. Sadighi, S., et al., *Lack of metformin effects on different molecular subtypes of breast cancer under normoglycemic conditions: an in vitro study*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(5): p. 2287-90.
35. Liu, B., et al., *Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(13): p. 2031-40.
36. Del Barco, S., et al., *Metformin: multi-faceted protection against cancer*. *Oncotarget*, 2011. **2**(12): p. 896-917.
37. Fan, G., et al., *Protein-tyrosine phosphatase 1B antagonized signaling by insulin-like growth factor-1 receptor and kinase BRK/PTK6 in ovarian cancer cells*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(34): p. 24923-34.
38. Liu, B., et al., *Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(17): p. 2959-66.
39. Burdall, S.E., et al., *Breast cancer cell lines: friend or foe?* *Breast Cancer Res*, 2003. **5**(2): p. 89-95.