



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA Y SUS RECEPTORES EN TEJIDO TUMORAL MAMARIO EN MUJERES CON PESO NORMAL U OBESIDAD QUE PRESENTAN CÁNCER DE MAMA NO HEREDITARIO”

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

### **PRESENTA:**

Q.F.B. Leticia Guadalupe Orozco Arguelles

### **TUTOR PRINCIPAL**

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina  
Facultad de Medicina, UNAM (Unidad Periférica de Investigación en Obesidad)

### **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dra. Diana María Escalante Alcalde  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Dr. Alfonso Dueñas González  
Instituto Nacional de Cancerología

CIUDAD DE MÉXICO. SEPTIEMBRE, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco 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: 705630/584935).**

**Agradecemos al Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica, CONACYT, Apoyo: 250786.**

**Se agradece al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP), por el apoyo económico otorgado, para asistir al “XLVI Congreso Nacional Mexicano de Patología Clínica”.**

**Este proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT, Apoyo IA204617, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.**

# **I. INDICE GENERAL**

<b>1 GENERALIDADES</b> .....	1
1.1 CÁNCER DE MAMA .....	1
1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE CÁNCER DE MAMA.....	2
1.3 CLASIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE MAMA .....	6
1.4 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE MAMA.....	8
1.5 SUBTIPOS DEL CÁNCER DE MAMA.....	9
1.6 FACTORES DE RIESGO.....	12
1. 6.1 FACTORES DE RIESGO BIOLÓGICO .....	12
1. 6.2 FACTORES DE RIESGO IATROGÉNICOS O AMBIENTALES .....	14
1.6.3 FACTORES DE RIESGO: LA HISTORIA REPRODUCTIVA.....	14
1. 6.4 FACTORES DE RIESGO: ESTILOS DE VIDA.....	15
1.7 OBESIDAD .....	17
1.8 EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD .....	18
1.9 CÁNCER DE MAMA Y OBESIDAD .....	20
1.10 ADIPOCINAS.....	23
1.11 ADIPONECTINA .....	25
1. 11.1 CONCENTRACIONES SÉRICAS.....	25
1. 11.2 ESTRUCTURA E ISOFORMAS .....	27
1.12 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ADIPONECTINA.....	29
1. 13 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ADIPONECTINA EN CANCER DE MAMA.....	31
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	36
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	37
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	37

<b>5. OBJETIVO</b> .....	38
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	38
<b>7. OBJETIVO SECUNDARIO</b> .....	38
<b>8. DISEÑO METODOLOGICO</b> .....	39
<b>9. CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b> .....	41
<b>10. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b> .....	41
<b>11. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN</b> .....	41
<b>12. ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	42
<b>13. METODOLOGÍA</b> .....	43
<b>14. ANÁLISIS ESTADISTICO</b> .....	44
<b>15. RESULTADOS</b> .....	45
<b>16. DISCUSIÓN</b> .....	59
<b>17. CONCLUSIONES</b> .....	64
<b>18. PERSPECTIVAS</b> .....	65
<b>19. REFERENCIAS</b> .....	66
ANEXO 1 .....	76
ANEXO 2 .....	79
ANEXO A.....	80
ANEXO B.....	82

## II. INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer.....	2
<b>FIGURA 2.</b> Tasas de incidencia y mortalidad mundial de cáncer en mujeres.....	3
<b>FIGURA 3.</b> Incidencia de cáncer de mama en mujeres.....	5
<b>FIGURA 4.</b> Tendencia de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres .....	19
<b>FIGURA 5.</b> Mecanismos estrógeno-dependiente en cáncer de mama en mujeres.....	22
<b>FIGURA 6.</b> A) Estructura y dominios de la adiponectina; B) Isoformas de adiponectina.....	27
<b>FIGURA 7.</b> Receptores de adiponectina: ADIPOR1 y ADIPOR2.....	30
<b>FIGURA 8.</b> Diferentes vías de señalización de la adiponectina.....	33
<b>FIGURA 9.</b> IHC: tejido tumoral mamario con marca antigénica negativa y positiva a adiponectina.....	46
<b>FIGURA 10.</b> IHC: expresión de adiponectina en tejido tumoral mamario.....	47
<b>FIGURA 11.</b> Porcentaje de área de tinción positiva para adiponectina entre pacientes con un IMC normal contra pacientes con un IMC de obesidad.....	49
<b>FIGURA 12</b> IHC: tejido tumoral con marca antigénica negativa y positiva a ADIPOR1.....	50
<b>FIGURA 13.</b> IHC: expresión de ADIPOR1 en tejido tumoral mamario.....	51
<b>FIGURA 14.</b> Porcentaje de área de tinción positiva para ADIPOR1 entre pacientes con un IMC normal contra pacientes con un IMC de obesidad.....	53
<b>FIGURA 15.</b> IHC: tejido tumoral con marca antigénica negativa y positiva a ADIPOR2.....	54
<b>FIGURA 16.</b> IHC: expresión de ADIPOR2 en tejido tumoral mamario.....	55
<b>FIGURA 17.</b> Porcentaje de área de tinción positiva para ADIPOR2 entre pacientes con un IMC normal contra pacientes con un IMC de obesidad.....	57
<b>FIGURA 18.</b> ELISA. Comparación de las concentraciones séricas de adiponectina entre el grupo de mujeres con CaM con un IMC normal vs IMC de obesidad.....	58

### III. ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Sistema de estadificación del cáncer TNM .....	6
<b>TABLA 2.</b> Clasificación de los tumores mamarios .....	7
<b>TABLA 3.</b> Agrupamiento de estadios clínicos del cáncer de mama .....	7
<b>TABLA 4.</b> Clasificación histopatológica del cáncer de mama (OMS) .....	8
<b>TABLA 5.</b> Subtipos del cáncer de mama definidos por IHC .....	9
<b>TABLA 6.</b> Clasificación del índice de masa corporal en adultos .....	17
<b>TABLA 7.</b> Ejemplos de adipocinas, citocinas y factores de crecimiento .....	24
<b>TABLA 8.</b> Factores que afectan la concentración de adiponectina .....	26
<b>TABLA 9.</b> Parámetros clínico-patológicos en mujeres con CaM .....	45
<b>TABLA 10.</b> Porcentaje de área de tinción positiva para adiponectina en mujeres con cáncer de mama .....	48
<b>TABLA 11.</b> Porcentaje de área de tinción positiva para ADIPOR1 en mujeres con cáncer de mama.....	52
<b>TABLA 9.</b> Porcentaje de área de tinción positiva para ADIPOR2 en mujeres con cáncer de mama.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	
ADIPOR1	receptor de adiponectina tipo 1
ADIPOR2	receptor de adiponectina tipo 2
Akt	proteína treonina quinasa
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AMPK	proteína quinasa activada por AMP
Bcl-2	célula-B CLL/linfoma 2
CaM	cáncer de mama
CSC	<i>cancer stem cells</i> o células cancerígenas
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
EGF	factor de crecimiento epidermal
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
HER2	receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HGF	factor de crecimiento hepático
HIF1 $\alpha$	subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
ICC	índice cintura cadera
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IGF1/2	factor de crecimiento similar a insulina tipo 1/tipo 2
IGFBP1	proteína ligadora del factor de crecimiento similar a insulina I
IHC	Inmunohistoquímica
IL-6	interleucina seis
ILC	carcinoma lobulillar infiltrante
IDC	carcinoma ductal infiltrante
IMC	índice de masa corporal
LDL	lipoproteínas de baja densidad
Ki-67	factor de proliferación celular
MAPK	proteína quinasa activada por mitogenos
MCP-1	monocito quimioatrayente proteína 1
mTOR	diana de rapamicina en mamífero
PAI	proteína activadora de plasminogeno
PI3K	fosfatidilinositol- 3-kinasa
PPAR- $\alpha$	receptor alfa de proliferación activado por peroxisoma
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RB	proteína del retinoblastoma
RE	receptor de estrógenos
RP	receptor de progesterona
EROS	especies reactivas de oxígeno
TAB	tejido adiposo blanco
TAM	tejido adiposo marrón
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
TZD	tiazolidinedionas
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular

# 1. GENERALIDADES

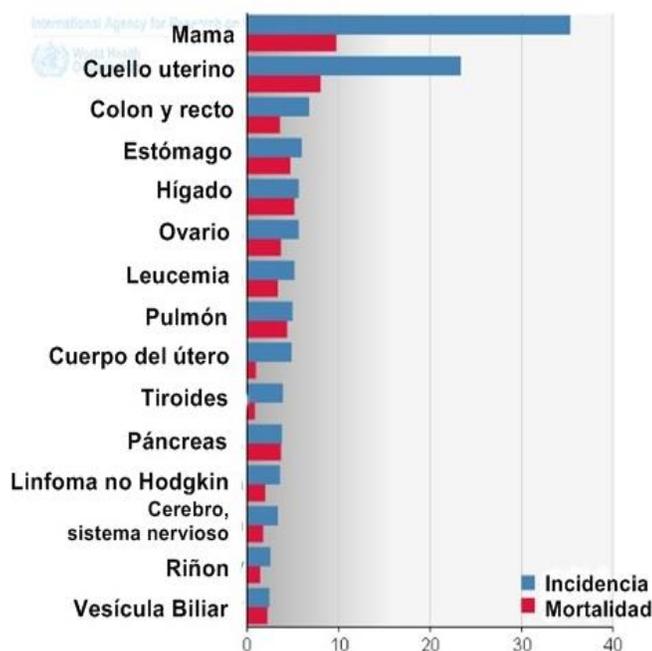
## 1.1 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CaM) es un conjunto de enfermedades de la glándula mamaria que se caracteriza por la adquisición de los marcadores principales o *hallmarks* (Hanahan y Weinberg, 2011) durante el proceso multipasos de la carcinogénesis —iniciación, promoción, progresión, invasión y metástasis— en las células epiteliales o lobulillares de la glándula mamaria, favoreciendo el establecimiento de un tumor maligno, el cual está compuesto por un grupo de células cancerosas que pueden crecer invadiendo los tejidos circundantes de la glándula o que pueden propagarse a áreas distales del cuerpo (Colditz y cols 2006; Yersal y cols, 2014).

En relación a su etiología, se ha estimado que los alelos de alta penetrancia en el gen BRCA-1 y 2, colectivamente explican alrededor 25% del riesgo heredado para CaM en humanos (Pharoah y cols, 2008). Dichos genes, han sido ampliamente estudiados y en la actualidad son de apoyo para el asesoramiento genético en individuos con cáncer familiar. Por otra parte del 15-20% de los casos con este cáncer, tienen antecedentes familiares, pero hasta la fecha, no se ha identificado a los genes responsables (Mincey, 2003). El mayor porcentaje de mujeres con este tipo de cáncer, son casos no hereditarios (alrededor del 80%), y actualmente se considera un padecimiento multifactorial —ya que no se puede identificar una sola causa o razón única que desencadene su aparición y desarrollo posterior—, en el cual la predisposición genética y la exposición a factores de riesgo endógenos y exógenos, el estilo de vida (menor actividad física, consumo de dietas altas en calorías, etcétera), la obesidad, entre otros, desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad (World Health Organization, 2006; Hulka y Moorman, 2001).

## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

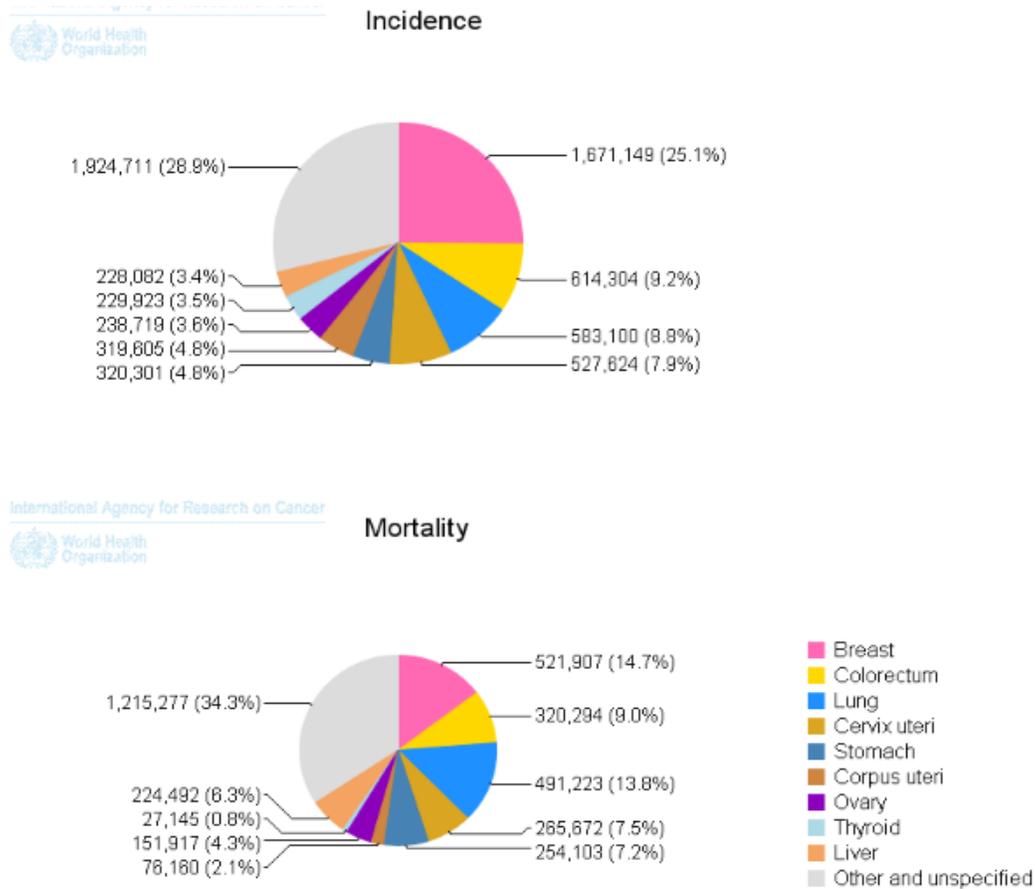
El CaM es un problema de salud pública mundial, ya que ocupa el segundo lugar de las neoplasias diagnosticadas en el mundo (1.38 millón, 10.9%), solamente detrás del cáncer de pulmón (World Cancer Research Fund International). Además, es el tipo de cáncer más común entre las mujeres (es casi exclusiva en las mujeres, pero los hombres también la pueden presentar) (Jemal y cols., 2011) en todo el mundo (tanto en las regiones más y menos desarrolladas), con un poco más de casos en los países menos desarrollados (883,000) que en los más desarrollados (794,000), (Globocan, 2012), (Figura 1).



**Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer estimadas por cada 100,000 mujeres en el mundo. El cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad. (Tomado de GLOBOCAN, 2012).**

De acuerdo con GLOBOCAN 2012, este cáncer representó el 25% (1,67 millones) del total de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2012, (Figura 2). Cabe mencionar, que aunque es la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres en países menos desarrollados (324,000 muertes, 14,3% del total), es ahora la segunda causa de muerte por cáncer en las regiones más desarrolladas (198,000 muertes, 15.4%) después del

cáncer de pulmón. El CaM representa una importante causa de muerte prematura, ya que 60% de las mujeres que mueren tiene entre 30 y 59 años de edad (Knaul y cols., 2009b).



**Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en mujeres de todo el mundo. El cáncer de mama ocupa la primera posición tanto en incidencia como mortalidad; 25.1% y 14.7% respectivamente, (Tomado de GLOBOCAN 2012).**

También existe cierta evidencia de que la edad promedio de inicio de la enfermedad es menor en los países en desarrollo que en los más desarrollados (Rodríguez-Cuevas y cols., 2000; Rodríguez-Cuevas y Capurso-García, 2006). Cabe mencionar que de igual forma existen diferencias en cuanto a la mortalidad, pues es en los países de bajos ingresos en donde ocurren la mayoría de los decesos, ya que generalmente el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad, debido a la falta de acceso a servicios de salud y a la

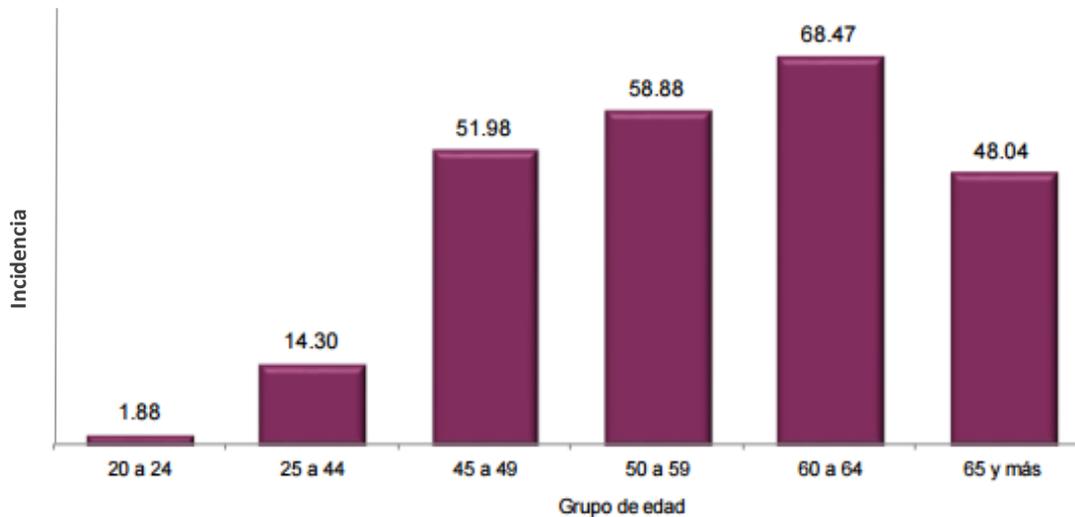
poca sensibilización para la detección precoz (conocimiento de signos, de síntomas iniciales y la autoexploración mamaria). Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015c) señalan que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad.

En México, la información epidemiológica nacional más actualizada referente a morbilidad y/o mortalidad por CaM son las estadísticas del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEGI), en que se registran el número de defunciones y sus causas.

En 2013, el CaM fue la principal causa de morbilidad hospitalaria entre los tumores malignos para la población mexicana de 20 años y más (18.7 por ciento); tres de cada 10 mujeres son hospitalizadas por dicha causa, y aunque en los varones apenas representa 0.7% de los ingresos hospitalarios por tumores malignos, desmitifica la creencia de que esta enfermedad sea exclusiva de las mujeres.

En cuanto a la incidencia (número de casos nuevos por cada 100 mil personas de cada sexo) de CaM para las mujeres, este aumentó en el intervalo de 2007 a 2014, presentándose en el año 2014 la mayor incidencia, con 28.75 casos nuevos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más.

La incidencia por grupos de edad para 2014, se observa que hasta antes de los 64 años hay un aumento en los casos nuevos de tumores malignos de mama conforme se incrementa la edad de la mujer, siendo en el grupo de 60 a 64 años donde se concentra el mayor número de casos nuevos (68 por cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad). Asimismo, se destaca el incremento que se da a partir de los 45 años, ya que la incidencia pasa de 14.30 (por cada 100 mil mujeres de 25 a 44 años) a 51.98 (en las del grupo de 45 a 49 años), (Figura 3).



**Figura 3. Incidencia de cáncer de mama en mujeres por grupo de edad. El grupo de 60 a 64 años de edad es el que tiene una mayor incidencia (Tomado y modificado del INEGI, 2014).**

Por otro lado, las estadísticas de mortalidad indican que la tasa de mortalidad por CaM se incrementó durante el periodo 2002-2008 de 14.9 a 16.8 defunciones por cada 100 mil mujeres mayores de 25 años (SSA México 2008a; SSA México 2008b). Esta tendencia desplazó al cáncer cérvico uterino como la principal causa de muerte por neoplasia maligna en mujeres mayores de 25 años.

La mayoría de los tipos de CaM comienza en las células que revisten a los conductos. Las células cancerígenas pueden invadir y/o crecer hacia otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. Si éstas células se propagan a los ganglios o vasos linfáticos (pueden comenzar a crecer en estos), por lo que existe una mayor probabilidad de que hayan alcanzado el torrente sanguíneo y se hayan propagado a otras partes del cuerpo (metástasis).

El Fondo de Investigación Mundial del Cáncer ha estimado, que alrededor del 30-40% de todos los tipos de cáncer se pueden atribuir a factores como: una alimentación inadecuada, a la inactividad física, la presencia de incremento ponderal y a la obesidad (Schelbert, 2009).

### 1.3 CLASIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE MAMA

La clasificación general de los diferentes tipos de cáncer generalmente se hace a partir del sistema de estadificación internacional TNM (Comité Americano Conjunto sobre el Cáncer; AJCC). Esta clasificación considera aspectos como desarrollo del tumor, diseminación del cáncer, el estadio del cáncer, además de estimar el pronóstico y valoración de cada paciente (Tabla 1).

El sistema TNM ayuda a describir el estadio de los diferentes tumores en forma detallada, enfocando el manejo clínico, decisión terapéutica (neoadyuvante o adyuvante), evolución tras tratamiento o pronóstico, unificación de criterios para proyectos de investigación y transmisión de datos entre centros.

**Tabla 1. Sistema de estadificación del cáncer TNM**

T→ Tumor	Tamaño y extensión del tumor primario o principal
N→ Nódulo linfáticos	Ausencia o presencia , así como la extensión metástasis ganglionares en los ganglios linfáticos de la zona
M→ Metástasis	Ausencia o presencia de afectación neoplásica a distancia; diseminación del tumor primario a otras partes del cuerpo

El sistema de clasificación TNM proporciona una estrategia de agrupación para pacientes con respecto a la terapéutica y pronóstico, que junto a cada componente se utilizan índices numéricos para expresar la extensión progresiva de la enfermedad (Tabla 2). Además el AJCC (por sus siglas en inglés) ha designado las etapas o los estadios de acuerdo a la clasificación TNM (Tabla 3).

Debido a que el cáncer de mama representa un estado patológico heterogéneo, en el cual se presentan muchas variaciones histológicas, existen dos clasificaciones más que son de gran utilidad: histopatológica y molecular.

**Tabla 2. Clasificación de los tumores mamarios, sus nódulos y metástasis**

<b>T =Tumor primario</b>	<b>N= Ganglios linfáticos regionales</b>
TX: El tumor primario no puede ser evaluado	NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
T0: No hay evidencia de tumor primario	NO: No hay metástasis regional de los ganglios linfáticos
Tis: Carcinoma in situ (carcinoma intraductal, carcinoma lobular in situ o enfermedad de Paget de pezón sin tumor que lo acompañe)	N1: Metástasis a ganglio o ganglios linfáticos axilares ipsilaterales móviles
T1: Tumor de 2.0 cm o menos en su mayor dimensión	N2: Metástasis a ganglio o ganglios linfáticos ipsilaterales unidos entre sí o a otras estructuras
T1a: Tumor de más de 0.1 cm pero no más de 0.5 cm en su mayor dimensión	N3: Metástasis a ganglio o ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales
T1b: Tumor de más de 0.5 cm pero no más de 1.0 cm en su mayor dimensión	
T1c: Tumor de más de 1.0 cm pero no más de 2.0 cm en su mayor dimensión	
T2: Tumor de más de 2.0 cm pero no más de 5.0 cm en su mayor dimensión	
T3: Tumor mide más de 5.0 cm en su mayor dimensión	
T4: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o la piel	
T4a: Extensión a la pared torácica	
T4b: Edema "piel de naranja", ulceración de la piel de la mama o nódulos satélites limitados a la misma	
T4c: Ambos casos mencionados arriba (T4a y T4b)	
T4d: Carcinoma inflamatorio	

<b>M= Metástasis distante</b>
MX: No se puede evaluar la presencia de metástasis distante
MO: No hay metástasis distante
M1: Presencia de metástasis distante (incluye metástasis a los ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales)

**Tabla 3. Agrupamiento de estadios clínicos del cáncer de mama.**

ESTADIO	T	N	M	Descripción
<b>0</b>	T1S	NO	MO	Carcinoma <i>in situ</i> (células anormales que no se han diseminado a tejidos cercanos)
<b>I</b>	T1	NO	MO	
<b>IIA</b>	T0	N1	MO	
	T1	N1	MO	
	T2	NO	MO	
<b>IIB</b>	T2	N1	MO	Entre más elevado es el estadio, mayor tamaño del tumor, extensión regional a ganglios y/o órganos cercanos al tumor primario
	T3	NO	MO	
<b>IIIA</b>	T0	N2	MO	
	T1	N2	MO	
	T2	N2	MO	
	T3	N1, N2	MO	
<b>IIIB</b>	T4	Cualquier N	MO	
	Cualquier T	N3	MO	
<b>IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1	El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo

## 1.4 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE MAMA

De acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002 (primera sección), Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama, establece que debe utilizarse el sistema de clasificación de los carcinomas mamarios de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), (Tabla 4).

**Tabla 4. Clasificación histopatológica del cáncer de mama (OMS)**

NO INVASORES ( <i>in situ</i> )	INVASORES O INFILTRANTES	OTROS
Ductal Lobulillar	Ductal Lobulillar Tubular (bien diferenciado) Medular Mucinoso Secretor Papilar Adenoideo quístico Metaplásico Apócrino	Enfermedad de Paget del pezón

\* En caso de observarse histologías combinadas se debe especificar el porcentaje de cada una de ellas (un solo tumor puede tener una combinación entre un cáncer invasivo e *in situ*).

Estadísticas en países donde el CaM se detecta principalmente por mamografías de escrutinio indican que del 15 al 30% de las neoplasias malignas de mama corresponden a carcinomas *in situ*, y el resto a carcinomas invasores o infiltrantes, de los cuales el 80% son ductales y el 15% lobulillares (Sharma y cols, 2010).

La mayoría de los tipos de cáncer de mama son carcinomas, ya que comienza en las células epiteliales que revisten los órganos y tejidos de la glándula mamaria, sin embargo cada tipo de carcinoma exhibe un amplio rango de fenotipos morfológicos y tipos histológicos específicos que tienen unas características clínicas y un pronóstico en particular (Comité Americano Conjunto sobre el Cáncer; AJCC).

## 1.5 SUBTIPOS DEL CÁNCER DE MAMA

El patrón morfológico de los carcinomas no siempre revela su comportamiento, ya que pacientes con el mismo tipo histológico pueden mostrar diferente curso de la enfermedad, debido a que los tumores expresan distintos genes que les confieren variabilidad biológica. Es por ello, que la clasificación histológica del cáncer de mama establecida por la OMS, se refuerza con la clasificación molecular (Perou y cols, 2000), debido que ésta, permite predecir el comportamiento clínico y biológico para cada caso de manera individual a través de los subtipos de CaM definidos mediante inmunohistoquímica (IHC), de tal forma que se pueden identificar con certeza aquellos casos que se pueden beneficiar con las diferentes terapias disponibles y también de las terapias en desarrollo que contemplan como dianas terapéuticas aquellas relacionadas con los diferentes vías de señalización intracelular (Dai y cols, 2015). Los subtipos de cáncer de mama definidos por IHC son: Luminal A, Luminal B, Basal y HER2+ (Tabla 5).

**Tabla 5. Subtipos de CaM definidos por IHC (Modificada de Dai y cols, 2015)**

Subtipo	IHC	Comportamiento
<b>Luminal A</b>	RE (+) y/o RP (+); HER2 (-); %Ki67 (<14)	Subtipo más común (40%) y menos agresivo. Tumores bien diferenciados. Buen pronóstico. Respuesta hormonal. Asociado a incremento de edad. Poco beneficio de quimioterapia.
<b>Luminal B</b>	RE (+) y/o RP (+); HER2 (+); %Ki67 (>14)	20%; Tumores moderado o poco diferenciado. Similar al subtipo Luminal A. Más frecuente RE(+)/RP(-). Pronóstico intermedio o malo. Beneficio intermedio de quimioterapia.
<b>Basal</b>	RE (-) y/o RP (-); HER2 (-); EGFR (+); %Ki67 (>14)	15%; Tumores de alto grado histológico e índice mitótico. Subtipo agresivo. Riesgo en edades menores (<40 años). Mal pronóstico. Alta respuesta a quimioterapia. Conocidos también como "triple negativo".
<b>HER2+</b>	RE (-) y/o RP (-); HER2 (+); %Ki67 (>14)	10%; Menos común. Tumores de alto grado histológico. Subtipo agresivo. Riesgo en mujeres <40 años. Mal pronóstico con buena respuesta a quimioterapia. Susceptibles a tratamiento específico contra el receptor HER2.

RE= receptor de estrógenos; RP= receptor de progesterona; Ki67= factor de proliferación celular; EGFR= receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER2= receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano.

El subtipo Luminal A es el más frecuente y el de mejor pronóstico. Corresponde al 40% de los tumores aproximadamente, y posee alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular, lo que permite su manejo con hormonoterapia. Aunque el subtipo Luminal B presenta una expresión disminuida de RE en comparación al Luminal A, y una expresión aumentada de genes de proliferación, también tiene un mejor pronóstico en comparación con el subtipo HER2+, ya que éste último, a pesar de tener una mejor respuesta a la quimioterapia y que cerca del 50% responde al tratamiento con trastuzumab, el pronóstico en general es malo (Rita Nahta, 2012). El subtipo basal se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas (CK5/6, CK17), mutaciones en p53, sobreexpresión de EGFR, ausencia de la expresión de RE y HER2. Este subtipo, además, se asocia a la mutación BRCA1 (cáncer de mama 1) y presenta el comportamiento más agresivo a pesar de su alta sensibilidad a la quimioterapia (Haupt B y cols., 2010; Lavasani MA y cols., 2014). Por último, los subtipos bajos en claudina son usualmente triple negativos, la tasa de supervivencia de esta subclasificación es intermedia entre los subtipos luminal y tipo basal (Yersal O y cols., 2014).

Se ha descrito que los tumores RE positivo tienen una menor respuesta a la quimioterapia comparado con los que carecen de estos receptores (Ring AE y cols., 2004). Los tumores luminales tienen un 6% de respuesta completa a quimioterapia preoperatoria, basada en paclitaxel seguida de 5-fluoracilo, doxorubicina y ciclofosfamida en comparación a 45% en los subtipos basal y HER2 (Rouzier R y cols., 2005).

Los subtipos moleculares muestran diferencias significativas en la predicción de la supervivencia global y libre de enfermedad. El subtipo triple-negativo (RE(-)/RP(-)/Her2(-)) tiene el pronóstico más desfavorable dentro de la clasificación molecular (Soutirou C y cols., 2009).

La clasificación molecular es posible realizarla de acuerdo a la caracterización molecular por inmunohistoquímica (IHC), la cual consiste en una técnica de inmunotinción mediante el uso de anticuerpos monoclonales marcados que reaccionan ante una variedad de antígenos específicos. Esta técnica se basa en la capacidad que poseen estos anticuerpos

marcados, que al unirse específicamente con su antígeno reacciona absorbiendo o emitiendo luz o produciendo una reacción colorimétrica (Pérez-Sánchez VM y cols., 2008; Candanedo G. F y cols., 2012; Rakha EA y cols., 2010). De esta manera se determina en el caso de CaM, la presencia (positividad) o ausencia (negatividad) de antígenos a receptores hormonales de estrógeno y progesterona, sobreexpresión de HER2 y del índice de proliferación celular (Ki67), los cuales se determinan con el objetivo de individualizar óptimamente el tratamiento. Por ejemplo, el uso de tamoxifeno (que es un modulador selectivo de los receptores a estrógeno) o inhibidores de la aromatasa para pacientes con RE (+)/RP (+) y el trastuzumab (anticuerpo monoclonal IgG contra el receptor de HER2) o lapatinib (inhibidor de la tirosina quinasa) para pacientes con HER2 (+), (Hammon ME y cols., 2010).

Los genes usados como marcadores moleculares sirven como factor pronóstico de evolución y tratamiento del CaM; y es por ello que dentro de los marcadores más utilizados para el establecimiento del tratamiento se encuentran principalmente los RE, RP, HER2 y Ki67.

## 1.6 FACTORES DE RIESGO

Debido a que el cáncer de mama es considerado un padecimiento multifactorial, la Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011 (segunda sección), establece que los factores de riesgo se clasifican en cuatro grupos: 1) biológicos, 2) iatrogénicos o ambientales, 3) de historia reproductiva, 4) de estilos de vida (estos son modificables, por lo que se puede disminuir el riesgo).

Los primeros no son modificables, mientras que los segundos escapan al control de la población, los del tercer grupo se asocian a beneficios en la salud reproductiva mayores que las posibles desventajas, y los del cuarto grupo son modificables y se enfocan a promover las conductas favorables a la salud que disminuyan el riesgo de desarrollar CaM.

### 1. 6.1 FACTORES DE RIESGO BIOLÓGICO

**Sexo:** ser mujer (el CaM es más frecuente en mujeres que en los hombres), debido a que en las mujeres existe una exposición a ciclos hormonales de estrógeno y progesterona, y estos tienen una implicación importante en la promoción del crecimiento de las células cancerosas en la glándula mamaria. Menos del 1% de los casos con CaM, será del sexo masculino.

**Edad:** ser mujer mayor de 40 años. La probabilidad de desarrollar CaM aumenta con la edad, por lo que hay un mayor riesgo.

**Historia personal o familiar:** antecedentes familiares de primera línea con cáncer de mama (madre, hijas o hermanas).

**Hiperplasia ductal atípica:** hallazgos por imagen radial o estrellada, así como también de carcinoma lobulillar *in situ* por biopsia. La hiperplasia atípica es la proliferación de más de dos células por encima de la membrana basal en el conducto o el lobulillo con alteraciones citológicas y/o estructurales. Cabe mencionar que los antecedentes de patologías benignas de mama tienen 4-5 veces más riesgo de desarrollar cáncer de mama que las mujeres que no muestran cambios proliferativos en su glándula mamaria.

**Menarca:** vida menstrual de más de 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años).

**Densidad mamaria:** la glándula mamaria está constituida principalmente por tejido adiposo, por lo que aquellas mujeres que muestren una mayor densidad de este tejido, podrían ser más susceptibles al desarrollo de CaM en conjunción con otros factores, debido a que los adipocitos pueden secretar adipocinas, citocinas inflamatorias y factores de crecimiento.

**BRCA1 o BRCA2:** ser portador conocido de mutaciones en estos genes, ya que son la causa más común de CaM hereditario. Estos genes producen proteínas que se encragan de la supresión tumoral e inhiben la proliferación celular (Murphy y cols., 2010).

**Otros factores genéticos:** de los genes más estudiados con una alta implicación en el desarrollo de cáncer de mama hereditario están TP53, PTEN1, STK11/LKB1 y CDH1 (Kuusisto y cols., 2011). Además de estos, también se consideran otros genes relevantes que se asocian a un elevado riesgo en esta enfermedad como ATM, CHEK2, BRIP1 y PALB2 (Karamiy y cols., 2013). Las mujeres con mutaciones en estos genes tiene un mayor riesgo de CaM, no obstante, solamente representan una pequeña parte del total de casos (alrededor del 5%).

-TP53: es un gen supresor de tumores que desempeña un importante papel en la activación de la apoptosis, el control del ciclo celular, la activación de enzimas de reparación del ADN. Sintetiza una proteína llamada p53 que inhibe el crecimiento de las células cancerígenas. Un gen TP53 defectuoso podría permitir que las células anormales proliferen y contribuyan en el desarrollo de cáncer (alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en dicho gen).

-PTEN1: es un gen supresor de tumores, implicado en la regulación del ciclo celular. Antagoniza la ruta de señalización PI3K-AKT/PKB defosforilando los fosfoinosítidos y por tanto modulando la progresión del ciclo celular y la supervivencia de la célula.

-STK11: este gen funciona como supresor de tumores. Defectos en este gen pueden generar un mayor riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama (Ripperger y cols., 2009)

-CDH1: es un gen supresor de tumores. La proteína CDH1 es una cadherina implicada en el proceso de adhesión célula-célula. La pérdida de función parece contribuir a la progresión del cáncer por un incremento en la proliferación celular, invasión y metástasis.

-CHEK2: este gen regula los puntos de control del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al daño en el ADN (Narod y cols., 2006). Además, también regula al supresor tumoral TP53 a través de la fosforilación de Thr-18 y Ser-20.

-PALB2: este gen codifica una proteína que interacciona con la proteína del gen BRCA2 para reparar el daño en el ADN, además de mantener la tasa de crecimiento y división celular (Rahman y cols., 2006).

### **1. 6.2 FACTORES DE RIESGO IATROGÉNICOS O AMBIENTALES**

**Radiaciones ionizantes o tratamiento con radioterapia en tórax:** exposiciones principalmente durante el desarrollo embrionario y/o crecimiento (in útero y/o durante la adolescencia). Esto se debe a que la radiación ionizante (incluye la radiación ultravioleta (UV), radón, rayos X y otras formas de radiación de alta energía), tiene suficiente energía para causar daño en el ADN, además que puede afectar el funcionamiento de órganos y tejidos. Las dosis bajas de radiación ionizante pueden aumentar el riesgo de efectos a largo plazo, tales como el CaM (American Cancer Society).

### **1. 6.3 FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON LA HISTORIA REPRODUCTIVA**

**Nuligesta o primer embarazo a término después de los 30 años de edad:** las mujeres nuligestas son aquellas que nunca se embarazaron o no tuvieron hijos. De acuerdo a la American Cancer Society los embarazos múltiples y quedar embarazada a una edad temprana reducen el riesgo del CaM en general, debido a que las células de la glándula mamaria alcanzan su maduración completa durante el embarazo y la lactancia (Russo J y cols, 2005). Y es por ello que estos factores están asociados con una disminución del riesgo de CaM, ya que reducen el número de ciclos menstruales en la mujer y, por lo tanto, reducen su exposición a hormonas endógenas (que pudiera haberse acumulado). Sin

embargo, para el subtipo de CaM triple negativo se ha visto que el embarazo puede aumentar el riesgo (Russo y cols, 2005).

Los factores de la reproducción que aumentan la duración y los grados de exposición a hormonas (estrógenos y progesterona), estimulan el crecimiento celular, y han sido asociados con un aumento del riesgo de CaM (Colditz GA y cols., 2006).

**Terapia hormonal en la peri o postmenopausia por más de cinco años:** las mujeres candidatas a recibir esta terapia (exposición prolongada de estrógenos) deberán tener una evaluación clínica completa y ser informadas sobre el riesgo mayor de padecer CaM, así como contar con estudio mamográfico basal (previo al inicio de la terapia y un control posterior a los 6 meses de iniciada la terapia) para evaluar los cambios de la densidad mamaria (American Cancer Society).

#### **1. 6.4 FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON ESTILOS DE VIDA**

**Alimentación rica en carbohidratos y baja en fibra:** estudios sugieren que la fibra en los alimentos está relacionada con un menor riesgo para ciertos tipos de cáncer (World Cancer Research Fund).

**Dieta rica en grasas tanto animales como ácidos grasos *trans*:** algunos estudios han observado que las personas que viven en países cuya alimentación contiene un nivel más elevado de grasa presentan tasas mayores de CaM (American Cancer Society).

**Obesidad:** debido a que es un estado de inflamación crónica de bajo impacto se ha descrito que esta condición está involucrada en la activación de cascadas de señalización como PI3K/Akt/mTOR, las cuales favorecen la proliferación celular, la angiogénesis, la evasión de la apoptosis y el incremento de metástasis (Sundaram 2013).

**Sedentarismo:** en un estudio de Women's Health Initiative, sugiere que con tal solo 1.25 a 2.5 horas a la semana de caminata rápida o a paso ligero se reduce el riesgo de CaM en un 18% (American Cancer Society, 2014). También, la Sociedad Americana Contra el Cáncer, recomienda una actividad física de intensidad moderada de al menos 150 minutos

o de 75 minutos de intensidad vigorosa por semana (o la combinación de ambas), para reducir el riesgo de CaM.

**Consumo de alcohol (mayor a 15 g/día):** múltiples estudios han demostrado una clara asociación entre el consumo de alcohol y un aumento del riesgo de CaM. Entre los mecanismos implicados que pueden contribuir en el proceso carcinogénico esta la descomposición del etanol (mediante la enzima alcohol deshidrogenasa) en acetaldehído y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales pueden ocasionar daño tanto en el ADN, las proteínas y lípidos. Además las bebidas alcohólicas pueden contener también una variedad de contaminantes cancerígenos que se introducen durante la fermentación, como son las nitrosaminas, fibras de asbesto, fenoles e hidrocarburos (Instituto Nacional del Cáncer).

**Tabaquismo:** existe evidencia de la asociación del tabaco con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (entre ellos el CaM), ya que de las sustancias químicas contenidas en el humo del cigarro (al menos alrededor de 250) se saben que son tóxicas o son considerados potenciales cancerígenos (sustancias que causan cáncer), p. e., el benzopireno, formaldehído, hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas, benceno, etcétera, pueden generar daños en el ADN, en proteínas y lípidos. La Agencia de Protección Ambiental de EE. UU., el Programa Nacional de Toxicología de EE. UU., y la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer han clasificado al humo de tabaco en el ambiente como cancerígeno humano conocido.

Dichos factores de riesgo en combinación con variables ambientales, estilo de vida y genéticas, como la herencia de las mutaciones genéticas BRCA1, BRCA2 (en aproximadamente una de cada mil mujeres), P53 y polimorfismo genéticos asociado a la síntesis de estrógenos y su metabolismo, son las que determinan la prevalencia del cáncer de mama (IMSS, 2015; OMS, 2015a). No obstante, los factores pronósticos y predictivos (TNM, RE, RP, HER2, y Ki67) utilizados clásicamente en CaM permiten diseñar estrategias de tratamiento para conocer mejor el pronóstico de cada paciente.

## 1.7 OBESIDAD

La obesidad se define como la presencia de una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo en un individuo (almacenada en forma de grasa). El índice de masa corporal (IMC) es un indicador de la relación entre el peso y la talla que se utiliza para identificar el sobrepeso y obesidad en adultos, siendo de este modo, un IMC mayor o igual 30kg/m<sup>2</sup> el que determina la obesidad (Tabla 6), (Organización Mundial de la Salud; OMS).

**Tabla 6. Clasificación del índice de masa corporal en adultos**

Insuficiencia ponderal	<18.5
Intervalo normal	18.5-24.9
Sobrepeso	≥ 25.0
Pre-obesidad	25.0-29.9
Obesidad	≥ 30.0
Obesidad Clase I	30.0-34.9
Obesidad Clase II	35.0-39.9
Obesidad Clase III	≥ 40.0

(Tomado y modificado de la OMS, 2016).

Se ha demostrado que cuando el IMC llega a niveles superiores a 35kg/m<sup>2</sup>, la obesidad puede favorecer el desarrollo de diversos tipos de neoplasias, además de que puede estar relacionada en múltiples patologías tales como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, dislipidemias, padecimientos cerebrovasculares, osteoarticulares, entre muchos otros (Cohen, 2008).

Por lo tanto, es considerada como un problema de salud pública, debido a su magnitud y trascendencia. Las consecuencias de las enfermedades crónicas asociadas a la obesidad van más allá de la salud, impactando en la productividad y desarrollo económico del país, aumentando con ello los costos directos e indirectos al tratar dicha enfermedad (Schelbert, 2009).

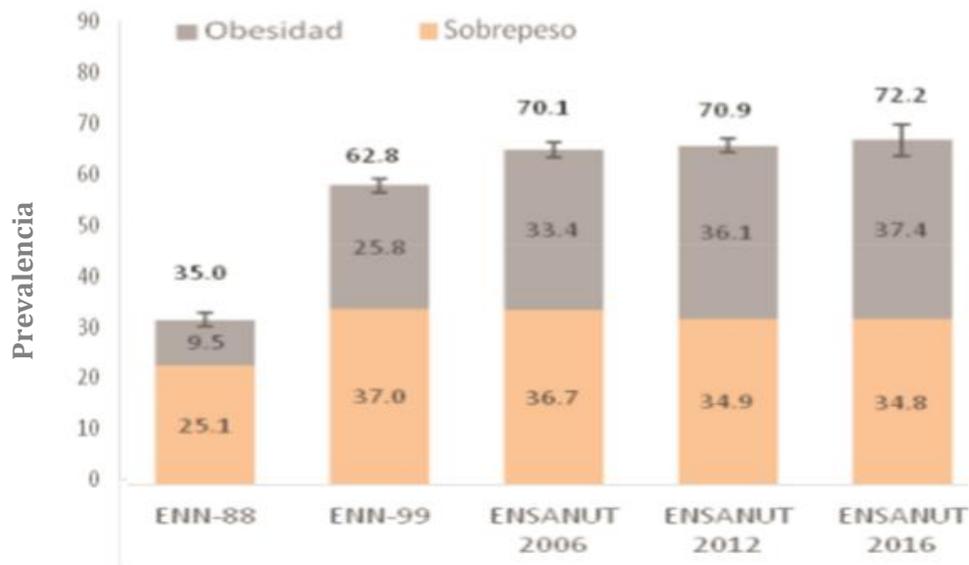
## 1.8 EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD

En 2014 más de 1900 millones de adultos de 18 años o más tenían sobrepeso (correspondiente al 39% de la población mundial; 38% hombres y 40% mujeres), de los cuales más de 600 millones eran obesos (lo que corresponde al 13% de la población adulta mundial; 11% hombres y 15% mujeres). En 2013, alrededor de 42 millones de niños menores de cinco años de edad tenían sobrepeso (Organización Mundial de la Salud; OMS).

En México, de acuerdo a la información proporcionada por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 (ENSANUT 2016), registró la distribución del estado nutricional de hombres y mujeres, de acuerdo a las categorías de IMC de los puntos de corte de la OMS. De acuerdo a los resultados de ésta, el 72.6% de los adultos tienen sobrepeso y obesidad.

La prevalencia de sobrepeso u obesidad ( $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) es mayor en las mujeres (87.7%) que en los hombres (65.4%), siendo la prevalencia de obesidad ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) mucho más alta en las mujeres. El sobrepeso en hombres tiene un valor máximo en un intervalo de edad correspondiente entre 60-69 años, mientras que para las mujeres la prevalencia más alta es entre 30-39 años. Por otro lado, en el caso de la obesidad, tanto para hombres como en las mujeres, la prevalencia de obesidad abdominal es significativamente más alta en los grupos de 40 a 79 años que en el grupo de 20 a 29 años.

De acuerdo al análisis de tendencias dentro de la clasificación del IMC en mujeres de 20 a 49 años de edad, se observó que en el periodo de 1988 a 2016 la prevalencia de sobrepeso incrementó 42.4% y la de obesidad 290.5%. A pesar de que la tendencia de sobrepeso se mantuvo entre el año 2012 y 2016, la prevalencia de obesidad aumentó (5.4%) (Figura 4) (ENSANUT 2016).



**Figura 4. Tendencia de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres de 20 a 49 años de edad (Tomada y modificada de ENSANUT 2016).**

Encuesta Nacional de Nutrición 1988 (ENN-88), Encuesta Nacional de Nutrición 1999 (ENN-99), Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006), Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012) y Encuesta Nacional de Salud y Nutrición medio camino 2016 (ENSANUT 2016).

\*Clasificación de IMC descrita por la Organización Mundial de la Salud: sobrepeso 25-29.9 kg/m<sup>2</sup> y obesidad ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>.

## 1.9 CÁNCER DE MAMA Y OBESIDAD

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 ocupa un lugar preponderante (Brown y Simpson, 2012; Wang y cols., 2012; Zhao y cols., 2012). Esto se debe a que en la obesidad los niveles de expresión de hormonas, factores de crecimiento, adipocinas y citocinas inflamatorias se encuentran alteradas, y estas a su vez pueden promover la iniciación, promoción, progresión, la supervivencia, metástasis, angiogénesis, disminución de apoptosis e invasión de las células cancerígenas (Khan y cols., 2013).

Con base en lo anterior, el enfoque de diversos estudios se ha encaminado hacia la relación del peso corporal al momento del diagnóstico del CaM (Rock y cols., 2002; Majed y cols., 2008; Nichols y cols., 2009), observando que el sobrepeso/obesidad aumentan el riesgo de desarrollo de la enfermedad, además, el estado del peso corporal impacta sobre el pronóstico con respecto a la sobrevida libre de enfermedad y/o mortalidad (World Cancer Research Fund).

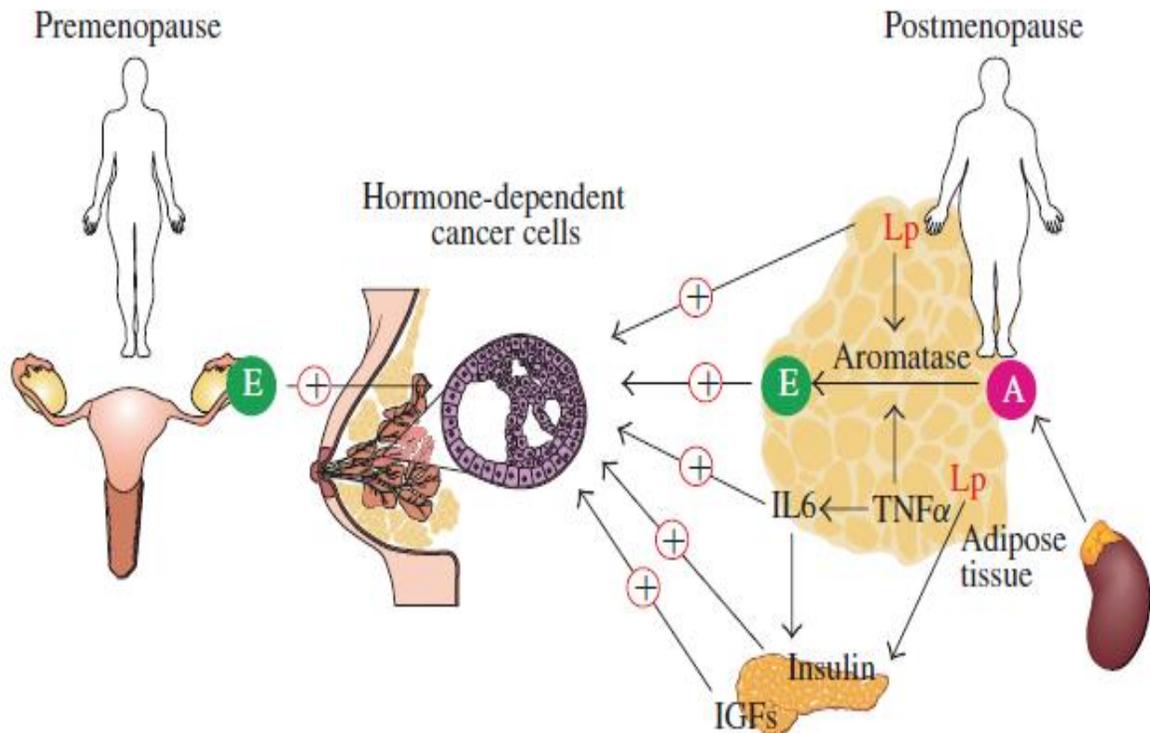
En un estudio de alrededor de 4,000 mujeres llevado a cabo en EE.UU. se determinó que por cada aumento de 5 kg en peso después del diagnóstico de CaM, aumentaba en 13% la mortalidad específica por este tipo de cáncer (Nichols y cols., 2009). De igual forma, se ha sugerido que las mujeres que presentan obesidad al momento del diagnóstico de CaM presentan un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad (Majed y cols., 2008), muerte por este cáncer (Dal Maso y cols., 2008) y de mortalidad general (mal pronóstico).

Es importante mencionar que los sujetos con obesidad no sólo aumentan el riesgo de desarrollar cáncer (Wolk y cols, 2001), sino que también aumentan su mortalidad con el incremento del IMC. Más específicamente, se ha identificado que la obesidad es un factor de riesgo para varios tipos de cáncer incluyendo cáncer de endometrio, cáncer de mama (especialmente después de la menopausia), colon y rectal, esofágico, renal, pancreático, biliar, ovárico, cervical y de hígado (Wolk *et al*, 2001, Larsson y Wolk, 2006). Asimismo, se ha demostrado en estudios con animales que la restricción calórica disminuye drásticamente la incidencia, multiplicidad y tamaño tumoral (Wolk et al, 2001; Larsson y Wolk, 2006).

Por otro lado, mientras algunos estudios refieren que la obesidad durante la premenopausia está inversamente relacionada con el CaM (Carmichael y Bates, 2004; Palmer y cols., 2007), otros estudios no encuentran asociación o una asociación positiva con este cáncer (Eng y cols., 2005; Cecchini y cols., 2012; Ogundiran y cols., 2012). En cambio durante la posmenopausia, la obesidad se relaciona positivamente con la incidencia de CaM (Carmichael y Bates, 2004; Lahmann y cols., 2004; Cheraghi y cols., 2012; Phipps y cols., 2012; Xu y cols., 2012). Se ha descrito que la obesidad aumenta el riesgo de CaM en un 30% en las mujeres posmenopáusicas y representa el 21% de todas las muertes por CaM en todo el mundo, (Danaei y cols., 2005; Rack y cols., 2010).

Por lo tanto, la obesidad es un factor de riesgo establecido para el CaM en mujeres posmenopáusicas, ya que la adiposidad está asociada con el incremento de las concentraciones de estrógenos e insulina, y tanto la evidencia experimental como observacional sostienen que estos factores participan en la tumorigenesis del CaM. Asimismo, los macrófagos se infiltran en el tejido adiposo (lo hacen en mayor grado en la obesidad), aumentando la producción de TNF- $\alpha$  en personas obesas, el cual está involucrado en el incremento de la síntesis de estrógeno.

Antes de la menopausia, la síntesis de estrógenos se da principalmente en los ovarios, mientras que para las mujeres posmenopáusicas con obesidad, el tejido adiposo es la fuente principal de la síntesis de estrógenos. Lo anterior, está relacionado linealmente con la adiposidad, y éste, es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de CaM (Carmichael, 2006; Cleary y Grossmann, 2009). Esto se debe a la aromatización periférica de los andrógenos suprarrenales (testosterona) a estrógenos por medio de la enzima aromatasa; como consecuencia hay un incremento de estrógenos, los cuales generan un efecto hormona-dependiente en las células cancerígenas, estimulando de este modo su crecimiento y su posterior migración (Macció, 2011), (Figura 5).



**Figura 5. Mecanismos estrógeno-dependiente en cáncer de mama en mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas. En las mujeres premenopáusicas la síntesis de estrógenos se da principalmente en el ovario, mientras que para las posmenopáusicas la fuente principal de síntesis de estrógenos se da en el tejido adiposo, ya que es en éste en donde se expresa la enzima aromatasa, la cual convierte los andrógenos y testosterona a estrógenos. Por lo tanto en mujeres con obesidad habrá un incremento de estrógenos, debido a este mecanismo. Por otro lado la obesidad está asociada con el incremento de la síntesis de insulina y por lo tanto de IGF, y estos a su vez, estimulan la degeneración neoplásica de las células epiteliales de la glándula mamaria. Por otra parte, los adipocitos producen diferentes adipocinas y citocinas inflamatorias, tales como: leptina (Lp), TNF- $\alpha$ , e IL-6, las cuales pueden influir en el incremento de la actividad de la enzima aromatasa (Tomado de Macció, 2011).**

Adicionalmente, la obesidad induce un estado de inflamación crónica de bajo impacto, que resulta en el aumento de las concentraciones locales y sistémicas de citocinas inflamatorias, adipocinas y factores de crecimiento, y que por lo tanto pueden influir en la actividad de la aromatasa y en la actividad de proliferación celular dependiente de estrógenos. Por ejemplo, las citocinas inflamatorias tal como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), están sobre-reguladas en la obesidad y se ha demostrado que promueve la iniciación y la progresión del CaM (Reddy y cols., 2013).

## 1.10 ADIPOCINAS

En mamíferos, el tejido adiposo puede diferenciarse morfológica y funcionalmente en tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo pardo o marrón (TAM). Ambos tienen la capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, pero presentan claras diferencias en cuanto a su morfología, distribución, expresión génica, así como su función (Cereijo y cols, 2014).

El TAM está implicado en la activación de la termogénesis a través de la activación de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), generando calor a partir de los ácidos grasos (lípidos almacenados como sustrato para generar calor), (Cereijo y cols, 2014). Recientes estudios han demostrado que el TAM pudiera estar implicado en la liberación de triglicéridos y en la utilización de glucosa, (Townsend y Tseng, 2012; Sidossis y Kajimura, 2015; Poher y cols, 2015).

Por otro lado, el TAB se encuentra extensamente distribuido en el organismo, principalmente a escala dérmica, subcútanea, mediastínica, mesentérica, perigonadal, perirrenal, y retroperitoneal (Cinti, 2001), siendo de ese modo el mayor reservorio energético del organismo. Participa en el control de la homeostasis lipídica, almacenando la energía sobrante en forma de triacilglicéridos y liberando ácidos grasos libres y glicerol cuando el gasto energético excede la ingesta de energía (Rosen y Spiegelman, 2006). Se sabe que en los individuos con obesidad se produce un notable aumento del TAB debido a hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos.

El TAB no solo es un reservorio de energía, sino en realidad es un órgano metabólico y secretor de una variedad de proteínas, tales como adipocinas, citocinas y factores de crecimiento (Tabla 7), los cuales tienen acción endocrina, paracrina y autocrina (Havel 2004). Estas proteínas poseen un papel autócrino importante en la fisiología del TAB y el control de la homeostasis energética, debido a que están implicadas en diferentes enfermedades ligadas a la obesidad (Khan 2013).

Es importante mencionar que las adipocinas son quimioatrayentes, pues se ha descrito que reclutan macrófagos y moléculas proinflamatorias (Marc J. Gunter 2015), los cuales desempeñan un importante rol en la etiología del CaM en mujeres con obesidad (Vona-Davis y Rose, 2007). Casi todas las concentraciones de las adipocinas se

correlacionan positivamente con el IMC, a excepción de la adiponectina, la cual se ha asociado en mayor grado con el desarrollo de este tipo de cáncer (Miyoshi y cols, 2003; Mantzoros y cols, 2004 Seruga y cols, 2008). En contraste con la mayoría de las adipocinas derivadas del tejido adiposo, las concentraciones de adiponectina en plasma se correlacionan negativamente con el IMC (Chandran y cols, 2003).

Se ha demostrado que la síntesis de adiponectina esta reducida en la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, y enfermedad coronaria (Saito y cols., 1999; Kishida y cols., 2003; Kadowaki y Yamauchi, 2005). Además, se ha visto que la expresión génica de la adiponectina puede ser regulada por la insulina; y la concentración plasmática de adiponectina está inversamente correlacionada con la insulina plasmática en ayunas (Hotta y cols., 2000).

**Tabla 7. Ejemplos de algunas adipocinas, citocinas inflamatorias y factores de crecimiento que se producen en el tejido adiposo.**

<b>Adipocinas</b>	<b>Adiponectina</b> Leptina Apelina Resistina Vaspina Quemerina Ometina Quimiocinas Hepcidina
<b>Citocinas inflamatorias</b>	MCP-1 TFN- $\alpha$ PAI IL-6
<b>Factores de crecimiento</b>	EGF HGF VEGF TGF- $\beta$

MCP-1= monocito quimioatrayente proteina 1.; TFN- $\alpha$ = factor de necrosis tumoral alfa; PAI=proteína activadora de plasminógeno 1; IL-6= interleucina seis; EGF= factor de crecimiento; HGF=factor de crecimiento hepático; VEGF= factor de crecimiento endotelial vascular; TGF- $\beta$ = factor de crecimiento transformador  $\beta$ .

## 1.11 ADIPONECTINA

### 1. 11.1 CONCENTRACIONES SÉRICAS

La adiponectina también llamada AdipoQ, Acrp30, apM1, y GP28 (Maeda y cols., 1996; Nakano y cols., 1996; Scherer y cols., 1995; Hu E y cols., 1996), es la adipocina más abundante secretada por los adipocitos, representando el 0.01% del total de proteínas en plasma. Desempeña un papel importante en el metabolismo energético (ya que estimula la oxidación de ácidos grasos y reduce los triglicéridos plasmáticos) y en el mantenimiento del tejido adiposo, además también participa en el metabolismo de la glucosa (mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina) y ácidos grasos (Weyer y cols., 2001).

Las concentraciones de adiponectina disminuyen en forma inversamente proporcional al peso, a la grasa corporal y al IMC; es decir, los individuos con obesidad, presentan concentraciones en suero más bajas de esta adipocina (Ryan y cols., 2003). Asimismo, se ha demostrado que la adiponectina reduce los valores plasmáticos de ácidos grasos libres y triglicéridos en modelos animales de obesidad e hiperlipemia. Este efecto se produce por un aumento en el catabolismo lipídico derivado de una estimulación de la expresión de enzimas implicadas en el transporte y el metabolismo de los ácidos grasos en el músculo esquelético y el hígado, como la acil-CoA oxidasa y la 5'-AMP cinasa (AMPK).

Las concentraciones plasmáticas de adiponectina en individuos sanos con un IMC normal (20-24.9 kg/m<sup>2</sup>) se miden generalmente en un rango de 5-30µg/mL, aunque se ha visto que los valores varían por edad, grupo étnico, sexo y por la metodología del ensayo (Snehalatha y cols., 2003; Chandran y cols., 2003). En las mujeres se presentan concentraciones de esta adipocina superiores al de los hombres.

La síntesis y secreción de adiponectina se regula por diferentes mecanismos, por ejemplo hay factores que afectan la concentración de adiponectina como los que se muestran en la Tabla 8. Del mismo modo, se ha demostrado que la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) estimulan su expresión génica *in vitro* (Beltowski J y cols., 2003). También los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR) están implicados en la regulación de la síntesis de adiponectina. En modelos animales se ha descrito que los agonistas de PPAR $\alpha$  reducen la expresión de adiponectina en el tejido

adiposo blanco, mientras que los agonistas de PPAR $\gamma$  (tiazolidinedionas o TZD) inducen su expresión (Yamauchi T y cols., 2001).

**TABLA 8. Factores que afectan la concentración de adiponectina**

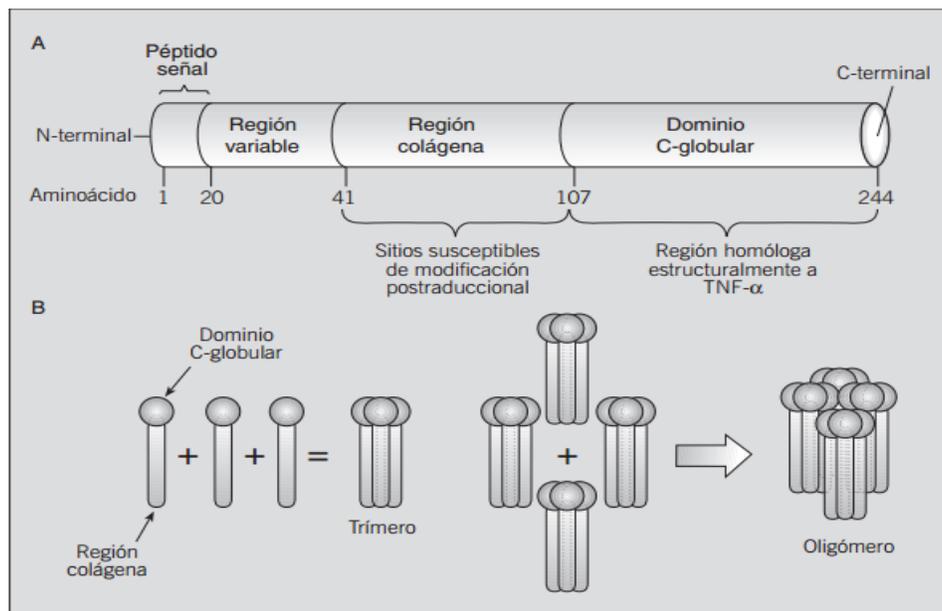
Factor	Concentración de adiponectina
Obesidad	↓
Sexo	↑ (M) ↓ (H)
Edad	↓
*Pérdida de peso	↑
Resistencia a la insulina	↓
Diabetes tipo 2	↓
Enfermedad coronaria arterial	↓
Diabetes gestacional	↓
Tratamiento con TZD	↑
TNF- IL-6	↓

M=mujeres; H= hombres; TZD= tiazolidinedionas; TNF- $\alpha$ = factor de necrosis tumoral alfa; IL-6= interleucina 6; \*Bypass gástrico o dieta.

Además, diversos estudios han comprobado que posee una actividad anti-mitogénica y efectos anti-proliferativos *in vitro* en células epiteliales de mama, por lo que esta inversamente asociada a la incidencia del CaM en algunas investigaciones prospectivas (Dalamaga y cols., 2012). Asimismo, estudios de casos y controles tanto retrospectivos como prospectivos han demostrado una asociación de niveles bajos de adiponectina sérica con aumento del riesgo de este cáncer. Sin embargo, los resultados son controversiales, ya que algunos de ellos describen que hay una asociación inversa de las concentraciones séricas de adiponectina, y el riesgo de CaM tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas (Miyoshi y cols., 2003; Chen y cols., 2006; Kang y cols., 2007; Macis y cols., 2012), mientras que otros refieren que solo se asocian con un mayor riesgo de CaM en las mujeres posmenopáusicas (Mantzoros y cols., 2004; Hou y cols., 2007; Tworoger y cols., 2007). Estas diferencias podrían deberse a las concentraciones de hormonas sexuales femeninas, especialmente los estrógenos, ya que la concentración de adiponectina sérica se correlaciona inversamente con la concentración de estradiol en suero en mujeres posmenopáusicas, pero no en las mujeres premenopáusicas (Miyatani y cols., 2008).

### 1. 11.2 ESTRUCTURA E ISOFORMAS

La adiponectina es un polipéptido de 244 aminoácidos (con un peso de 30kDa aproximadamente) codificado por el gen *ADIPOQ*, que se encuentra localizado en el cromosoma 3p27. Estructuralmente está conformada por cuatro distintos dominios: el primer dominio es un péptido señal situado en el extremo amino-terminal (N-terminal), el segundo es un dominio variable que consta de una región de 28 aminoácidos que varía entre especies, el tercero es un dominio de 65 aminoácidos similar a colágeno y el último es un dominio globular, el cual se encuentra en el extremo carboxi-terminal (C-terminal), (Figura 6).



**Figura 6. A) Estructura y dominios de la Adiponectina. B) La unidad estructural básica de la adiponectina es la isoforma trímica, formada por la unión de 3 monómeros mediante el dominio globular. Del mismo modo, los trímeros de adiponectina pueden asociarse a su vez en grupos de 2 para generar la isoforma hexamérica (LMW) o de 4 a 6 unidades para generar la isoforma de alto peso molecular (HMW), mediante el dominio colágeno. (Tomado de Palomer y cols., 2005)**

Una vez sintetizada, la adiponectina puede sufrir modificaciones pos-traduccionales por hidroxilación y glicosilación (se han identificado cuatro residuos de prolina y lisina conservados en la región del dominio colágeno; además de un residuo más de lisina en el

dominio hipervariable), lo que genera múltiples isoformas: trimérica (90kDa), hexamérica (180kDa) (LMW), y de alto peso molecular (360-400kDa) (HMW), (Wang y cols, 2006; Wang y cols, 2008). Además de estas tres isoformas, también existe una forma globular, la cual se genera por clivaje proteolítico por una elastasa de leucocitos (una serina proteasa secretada por monocitos y neutrófilos) a partir de la isoforma HMW de adiponectina. El estado de oligomerización de la adiponectina es un factor importante en la regulación de su función. Se ha reportado en múltiples estudios que la isoforma HMW es la biológicamente más activa (Fisher y cols., 2005; Wang y cols., 2006; Trujillo y cols., 2005; Hada y cols., 2007).

El gen de adiponectina está formado por tres exones y 2 intrones, y está regulado principalmente por PPAR, C/EBP y ADD1 (Gustafson, 2003), los cuales son claves en la adipogénesis.

## 1.12 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ADIPONECTINA

La adiponectina actúa a través de sus receptores ADIPOR1 y ADIPOR2, que son proteínas integrales con siete dominios transmembranales con el extremo N-terminal interno, y el extremo C-terminal en la parte externa, al contrario de otros receptores acoplados a proteína G (Yamauchi y cols., 2003). Estos receptores son significativamente homólogos con 67% de identidad de aminoácidos, y se conservan estructuralmente especialmente en los siete dominios transmembranales.

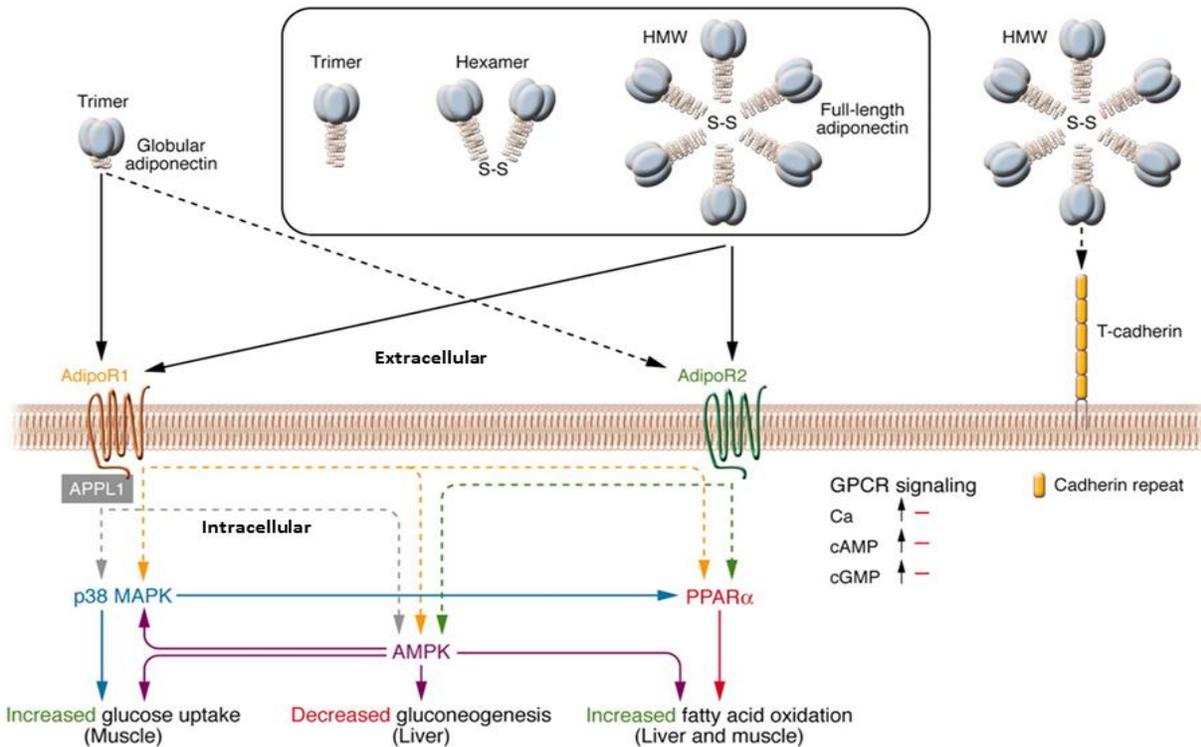
Los efectos biológicos de la adiponectina no dependen solo de sus concentraciones circulantes en plasma y de las propiedades de sus diferentes isoformas, sino también de la expresión de sus subtipos de receptores, que son tejido específicos.

Cuando adiponectina actúa sobre los receptores ADIPOR1, incrementa la captación de glucosa en músculo y disminuye la gluconeogénesis en hígado, favoreciendo de esta forma la sensibilidad a la insulina, mientras que al unirse a los receptores ADIPOR2, aumenta la oxidación de ácidos grasos (catabolismo lipídico) en hígado y músculo; lo que provoca un descenso en la concentración de glucosa y ácidos grasos libres en la sangre (Figura 7).

ADIPOR1 está acoplada a la vía AMPK, que a su vez está asociada a mTOR, la cual regula la traducción de proteínas que regulan el crecimiento celular (Miyazaki y cols., 2005), de este modo adiponectina puede ejercer su efecto inhibitor sobre el crecimiento de las células tumorales. Por otro lado ADIPOR2 está vinculado a la activación del receptor gamma de proliferación activado por peroxisoma (PPAR $\gamma$ ), el cual induce la transcripción de varios genes implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Ajuwon KM y cols., 2005). PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción muy importante en la regulación de genes expresados en los adipocitos y que están implicados en el metabolismo lipídico y en la diferenciación de los adipocitos.

Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han evidenciado una importante participación de la adiponectina así como de sus receptores en el desarrollo y pronóstico del CaM no hereditario, especialmente en mujeres con obesidad. La adiponectina y sus receptores tienen un efecto protector en la génesis del CaM, ya que es anti-angiogénico y anti-proliferativo (Wang y cols, 2005; Dos Santos y cols, 2008; Molica y cols, 2009;

Sugiyama y cols, 2009; Saxena y cols 2010). Algunos estudios han documentado concentraciones séricas de adiponectina reducidas en pacientes con este tipo de cáncer (Mantzoros y cols, 2004; Körner y cols, 2007).



**Figura 7. Receptores de adiponectina: ADIPOR1 y ADIPOR2. Los receptores ADIPOR1 tienen gran afinidad por la adiponectina globular y baja afinidad por la adiponectina de longitud larga o peso molecular alto (HMW). En cambio los ADIPOR2 tienen afinidad intermedia para ambas formas de adiponectina. Cuando adiponectina actúa sobre los receptores ADIPOR1 incrementa la captación de glucosa y disminuye la gluconeogénesis; al unirse a los ADIPOR2, aumenta la oxidación de ácidos grasos (Tomado de Elissondo, 2008).**

Por último, la T-cadherina es un receptor —que actúa como correceptor— de la superficie celular localizado en las células del músculo endotelial y liso, que está implicado en la interacción célula-célula. Se sabe que las isoformas HMW se unen fuertemente a este receptor, pero no las formas triméricas y globulares de adiponectina (Hug et al, 2004).

## 1.13 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ADIPONECTINA EN CÁNCER DE MAMA

La adiponectina se ha asociado en mayor grado con el desarrollo de CaM (Grossmann y Cleary, 2012). Esto se debe a que los adipocitos son el elemento predominante estromal en la glándula mamaria, por lo que adiponectina tiene una mayor influencia parácrina sobre el epitelio mamario.

Las concentraciones bajas de adiponectina en circulación están asociados con un mayor riesgo de CaM (Miyoshi y cols, 2003, Chen y cols, 2005) independientemente de la edad, estado de los receptores hormonales (RE y RP), metástasis de los ganglios linfáticos, y HER2. Algunos estudios, han sugerido que los tumores de mama (con un tamaño grande de tumor y alto grado histológico) que surgen en mujeres con niveles bajos de adiponectina (hipoadiponectinemia) en suero pueden tener un fenotipo más agresivo (Mantzoros y cols, 2004; Khan y cols, 2013).

Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la adiponectina reduce el proceso carcinogénico en la glándula mamaria a través de múltiples vías. Los posibles mecanismos de acción de la adiponectina en la prevención del cáncer son diversos; por ejemplo, en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) se ha señalado que bloquea el efecto proliferativo de IGF-I, a través de un mecanismo que implica un aumento de la fosforilación de la AMPK- $\alpha$  y una disminución de Akt activada. También aumenta las concentraciones intracelulares de AMPc y la actividad de la proteína cinasa A (PKA) (Li y cols., 2011). Además puede bloquear las acciones de proliferación celular de diferentes factores de crecimiento que podrían ser responsables del desarrollo y progresión del CaM; del mismo modo, puede reducir la migración e invasión de la células cancerígenas (Taliaferro-Smith y cols., 2009).

La adiponectina es antagonista de la leptina y a través de la vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) reduce la actividad de la aromatasa, la producción local de estrógenos, y la proliferación (Fresno Vara JA y cols., 2004).

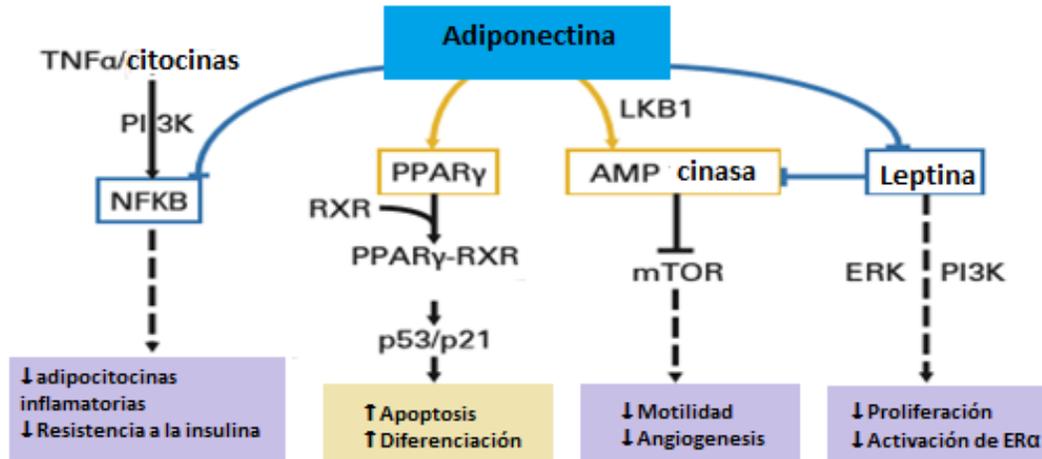
Asimismo, se ha visto que puede inhibir la activación del factor nuclear kB (NFkB) por citocinas inflamatorias, como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), reduciendo así la producción subsecuente de adipocitocinas inflamatorias (Bastian Hoesel y cols., 2013). Además, NFkB es un factor de transcripción que regula positivamente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células de cáncer de mama, por lo que en estudios *in vivo* se ha visto que puede inhibir la neoangiogénesis tumoral (Molica y cols., 2009).

Mediante la regulación positiva del receptor de proliferación activado por peroxisoma (PPAR) que forma heterodímeros con el receptor de retinoides X, la adiponectina promueve la diferenciación y la apoptosis a través de mecanismos dependientes de p53. Además de regular positivamente el supresor de tumores LKB1 y aumentar el AMPc, que a su vez bloquea la activación de la vía mTOR lo que reduce la motilidad y la angiogénesis (Figura 8), (Fabian 2011).

Cabe mencionar que cuando AMPK esta fosforilado activa TSC2, un supresor de tumores que regula negativamente la síntesis de proteínas mediante la inhibición de mTOR, y este último se ha asociado con cáncer de colon, mama, próstata, ovario, hígado y pulmón (Inoki y cols., 2003). La regulación de TSC2 y mTOR por AMPK podría tener implicaciones importantes ya que la activación de la vía de señalización PI3K-Akt es constitutiva en muchos tipos de cáncer. La activación de la AMPK por la adiponectina también activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y aumenta la producción de óxido nítrico (NO). La activación de eNOS también depende de la señalización a través de Akt y de PI3K (Ouchi et al, 2005). La adiponectina inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno posiblemente a través de la inhibición de la actividad celular de NADPH oxidasa (Goldstein y Scalia, 2004). La reducción de la generación de ROS puede aumentar la producción de NO y reducir la proliferación celular mediante el bloqueo de la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) activada por la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL), (Goldstein y Scalia, 2004).

Por último, la adiponectina también puede regular la angiogénesis negativamente (independientemente de la AMPK) mediante la inducción de la apoptosis en células

endoteliales vasculares mediante la activación de la cascada de caspasas, un grupo de enzimas apoptóticas. La adiponectina activa inicialmente la caspasa-8, que posteriormente conduce a la activación de las caspasas-9 y -3, lo que a su vez conduce a la muerte celular (Brakenhielm et al, 2004).



**Figura 8. Diferentes vías de señalización por las que la adiponectina ejerce su efecto, ya sea una modulación inhibitoria (azul) o estimulante (oro) la cual produce efectos a nivel celular y del tejido que pueden reducir potencialmente el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Tomado y modificado de Fabian 2011).**

Recientemente se ha descrito que algunos fármacos antidiabéticos, particularmente los de la clase de las tiazolidinedionas (TZD), incrementan la expresión y la concentración plasmática de adiponectina mediante la activación de PPAR-  $\gamma$  (Arner P 2003). En contraste, la metformina mejora significativamente la sensibilidad a la insulina y aumenta la captación de glucosa en el tejido muscular de pacientes con diabetes tipo 2 pero sin modificar los valores de adiponectina (Phillips SA y cols., 2003).

Las TZD aumentan la síntesis de la lipoproteína lipasa, la proteína transportadora de ácidos grasos y la acetil-CoA sintetasa mediante la activación de PPAR $\gamma$ , estimulando globalmente el almacenamiento de ácidos grasos en los adipocitos, la reducción de los triglicéridos plasmáticos y el aumento de las HDL (Phillips SA y cols., 2003). En el tejido

adiposo subcutáneo, las TZD promueven la diferenciación de los adipocitos, produciendo células más pequeñas y sensibles a la insulina.

Por otro lado, fármacos que disminuyen los lípidos como las estatinas hidrofílicas, los ácidos grasos como el omega 3, y los fibratos, también incrementan la expresión de adiponectina (Banga A y cols., 2009). Del mismo modo sucede con los antihipertensivos como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los  $\beta$ -bloqueadores que incluye a los agonistas B2, además de algunos nutraceuticos tales como la curcumina se ha informado que incrementan su secreción.

La cirugía bariátrica en mujeres con obesidad (con pérdidas de peso del 14-25%), conduce a aumentos importantes de adiponectina y a la reducción del riesgo de CaM incluso en mujeres jóvenes. Aunque el ejercicio vigoroso puede aumentar modestamente las concentraciones de adiponectina, la reducción del tejido adiposo es necesaria para modificar significativamente la adiponectina circulante de tal manera que el ejercicio aeróbico moderado en ausencia de pérdida de peso tiene poco efecto.

Existen pocos estudios enfocados en la expresión de adiponectina y de sus receptores en tejido tumoral mamario de pacientes con CaM. Por ejemplo, Young-Ju Jeong y cols, (2011) realizaron un estudio de casos en donde analizaron mediante inmunohistoquímica (IHC) dos tipos de cáncer de mama (carcinoma *in situ* y carcinoma infiltrante o invasivo), y observaron una asociación entre la sobreexpresión de adiponectina y de sus receptores y la progresión e invasividad en los tumores con carcinoma infiltrante (la expresión de esta adipocina y sus receptores fue mayor en el carcinoma infiltrante respecto al carcinoma *in situ*). De esta manera, ellos sugieren que la adiponectina podría estar asociada con la progresión y la invasión del CaM en etapas tardías.

Por otra parte, Taliaferro-Smith L y cols, (2009) también encontraron una mayor expresión de adiponectina en mujeres con carcinoma ductal infiltrante en comparación con el carcinoma ductal *in situ*, además la expresión de adiponectina fue mayor en el tejido adyacente normal que en el tejido neoplásico. Esto sugiere que la expresión de adiponectina es tejido-especifico.

En cuanto al estudio de la expresión de los receptores de adiponectina, se ha visto una mayor expresión de ADIPOR1 en los diferentes tipos de cáncer que están fuertemente asociados con la obesidad (cáncer renal, melanoma, carcinoma hepatocelular) en comparación con los cánceres no asociados a esta patología, los cuales tienen una menor expresión (p.e. carcinoma epitelial ovárico) (Sharon y cols., 2010). En relación al CaM, se ha observado una mayor expresión de ADIPOR2, el cual se asocia con invasión vascular (Pfeiler G y cols., 2009), pero en los carcinomas gástricos, una mayor expresión de ADIPOR1 y/o ADIPOR2 se asocia positivamente con una mayor supervivencia global (Barresi V y cols., 2009). Recientemente, en un estudio en donde se compararon en una línea celular metastásica triple negativo (MDA-MB-231) los efectos de dos diferentes isoformas de adiponectina (globular vs HMW) sobre el potencial de metástasis de las células de CaM, se encontró que la isoforma globular de adiponectina (gAd), aumentó tanto la migración como la invasión (Emily Falk y cols, 2016).

Dado que la obesidad es un factor clave asociado con la expresión y las concentraciones circulantes de adiponectina, en donde el IMC ésta relacionado con la síntesis de ésta adipocina y de sus receptores en el tejido mamario, la cuantificación de la expresión de adiponectina podría permitir la caracterización de los pacientes en función del riesgo de desarrollar complicaciones. Sin embargo, es importante remarcar que los estudios referidos arriba, tomaron en cuenta únicamente la relación de la adiponectina y /o sus receptores con el CaM y no realizaron la comparación en subgrupos de acuerdo al IMC y su asociación con un CaM más agresivo.

Por lo tanto, con base en todo lo anterior y al no tenerse un consenso entre las diferentes investigaciones realizadas hasta el momento, el estudio de la expresión de adiponectina y sus receptores (ADIPOR1 y ADIPOR2) es un área de investigación activa, particularmente en tejido tumoral mamario, por lo que se necesitan mayores estudios, ya que es un objetivo particularmente atractivo enfocado en la prevención y/o tratamiento del paciente con cáncer de mama, en particular para las mujeres con sobrepeso u obesidad. Además que esto permitirá dilucidar el posible papel predictivo de adiponectina y sus receptores.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte entre las mujeres en diversos países del mundo, incluyendo a México. Se ha estimado que en nuestro país, solo el 10% de los casos son diagnosticados en estadio I, lo que se traduce en una elevación importante de los costos de atención promedio por año-paciente, los cuales se incrementan mientras más tardía es la detección. Aunado a lo anterior, la obesidad se ha asociado con una larga lista de entidades patológicas, como son algunos tipos de neoplasias; en relación con aquellos tipos de cánceres en los cuales se ha postulado que la obesidad aumenta el riesgo de morbilidad y/o mortalidad, el cáncer de mama ocupa un lugar preponderante. Además la obesidad es un factor de riesgo establecido para el CaM en mujeres posmenopáusicas, ya que diversos estudios han demostrado que las mujeres con obesidad al momento del diagnóstico de CaM presentan un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad, así como a un mal pronóstico, lo cual hace imprescindible el identificar marcadores de predisposición y de progresión de la enfermedad.

Diversos estudios han demostrado una participación importante de la adiponectina así como de sus receptores en el desarrollo y pronóstico del CaM no hereditario, especialmente en mujeres con obesidad. Esta adipocina muestra una correlación negativa con el IMC, y algunos estudios han documentado concentraciones séricas de adiponectina reducidas en pacientes con este tipo de cáncer.

Por lo anterior, el análisis de esta adipocina y de sus receptores en el tejido tumoral mamario pudiera(n) ser un marcador útil (es) para el pronóstico y la identificación de los casos con un alto riesgo de metástasis.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En México, la prevalencia de obesidad y la incidencia de CaM se incrementan año con año y el diagnóstico de CaM es tardío. La etapa localmente avanzada es predominante y en consecuencia la sobrevida de la mujer mexicana con este tipo de cáncer es menor comparada con la de mujeres con esta patología en otros países. Además la asociación de la obesidad a un mayor riesgo de recurrencia de CaM, así como a un mal pronóstico, hacen imperioso el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. El determinar si existen diferencias entre la expresión de adiponectina y sus receptores (ADIPOR1 y ADIPOR2) con respecto al IMC, podría demostrar la presencia de nuevos marcadores de riesgo que participan o se correlacionan con el comportamiento clínico del CaM.

Con base en lo anterior se planeó la siguiente pregunta de investigación:

¿La expresión de adiponectina y sus receptores (ADIPOR1 y ADIPOR2) se asocian con el comportamiento clínico-patológico del cáncer de mama no hereditario en mujeres postmenopáusicas con normopeso y obesidad?

### **4. HIPÓTESIS**

1. La expresión de adiponectina en el tejido tumoral mamario de las mujeres postmenopáusicas obesas con CaM no hereditario será menor en comparación con el grupo de IMC normal.
2. La expresión de los receptores de adiponectina (ADIPOR1 y ADIPOR2) será menor en las mujeres con IMC normal respecto a las mujeres con obesidad.

## **5. OBJETIVO**

Analizar la expresión de la adiponectina y de sus receptores (ADIPOR1 y ADIPOR2) en tejido tumoral mamario de mujeres postmenopáusicas con IMC normal y con IMC de obesidad, que presentan CaM no hereditario.

## **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 6.1** Comparar la expresión de la adiponectina y de sus receptores en el tejido tumoral mamario de las mujeres postmenopáusicas con CaM no hereditario con IMC normal e IMC de obesidad.
- 6.2** Analizar la expresión de la adiponectina y de sus receptores en el tejido tumoral mamario de mujeres postmenopáusicas con CaM no hereditario con normopeso y obesidad se asocia con el comportamiento clínico del CaM.

## **7. OBJETIVO SECUNDARIO**

- 7.1** Analizar las concentraciones séricas de adiponectina en mujeres postmenopausicas con CaM no hereditario con normopeso y obesidad.

## **8. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **8.1 TIPO DE ESTUDIO**

Estudio observacional y prospectivo.

### **8.2 SUJETOS**

Este protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética tanto del Instituto de Enfermedades de la Mama, FUCAM, como por la Facultad de Medicina, UNAM. Este estudio se llevó a cabo con muestras de tejido tumoral de mujeres de origen étnico mestizo-mexicano con CaM no hereditario (sin antecedentes familiares de primer grado de CaM), las cuales fueron reclutadas del Instituto de Enfermedades de la Mama, FUCAM A.C.

Se incluyeron 50 mujeres (25 con peso normal y 25 con obesidad) postmenopáusicas con CaM no hereditario. A todas las participantes, se les dio toda la información del estudio y se procedió a la lectura de la carta de consentimiento informado (ANEXO A), las mujeres que aceptaron participar en el estudio firmaron la carta de consentimiento informado y se procedió a la toma de una muestra única de sangre periférica de aproximadamente 5 ml (para cuantificación de adiponectina sérica); asimismo, se les solicitó el acceso al tejido tumoral fijado en parafina para la realización de la inmunohistoquímica (IHC) e identificación de la adiponectina y sus receptores (ADIPOR1 y ADIPOR2). Las mujeres fueron divididas en dos grupos: 1) pacientes de peso normal ( $IMC = 20-24.9 \text{ kg/m}^2$ ) y, 2) pacientes con obesidad ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ).

A las mujeres participantes se les determinó los siguientes factores pronósticos:

1. Edad de la paciente.
2. Tamaño del tumor: TX (no se puede valorar la presencia de tumor primario), T0 (no hay evidencia de tumor primario), T1 (tumor pequeño), T2 y T3 (tumor de tamaño mediano), T4 (tumor grande).

3. Estado ganglionar (+ o -): NX (no se pueden valorar nódulos linfáticos regionales), N0 (no hay implicación de nódulos linfáticos regionales), N1, N2, N3 (implicación en incremento de nódulos linfáticos regionales).
4. Grado histológico: GX no es posible asignar un grado (Grado indeterminado), G1 bien diferenciado (Grado bajo), G2 moderadamente diferenciado (Grado intermedio), G3 Mal diferenciado (Grado alto) y G4 Indiferenciado (Grado alto).
5. Panel inmunohistoquímico (IHC): Estado del receptor-2 del factor de crecimiento epidermal humano (HER2 positivo o negativo); Estado de receptores hormonales (Receptor de Estrógenos y Receptor de Progesterona positivos o negativos), así como del factor de proliferación Ki67. Cabe mencionar que la mastografía y la cuantificación de los receptores hormonales (estrógenos y progestágenos), de HER2 y de Ki67, se realiza de rutina en el FUCAM.

También se recopilarán los datos de las participantes: edad, características demográficas, antecedentes médicos, personales y familiares, consumo de alcohol, antecedentes de tabaquismo, terapia de reemplazo hormonal, edad del primer embarazo a término, edad de la menarquía y la menopausia. Además del estadio y grado histológico, se analizarán los factores clínico-patológicos y pronósticos del CaM: modalidades de tratamiento adyuvante (tratamiento de hormonas y/o trastuzumab), tamaño del tumor, estado ganglionar, y los resultados de la inmunohistoquímica de los cuatro factores biológicos diferentes (receptor a estrógenos, receptor a progesterona, HER2 y Ki-67 — positivos o negativos, según cada caso, y su índice).

## **9. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- I.** Con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama operable en mujeres posmenopáusicas, con un IMC de 20-24.9kg/m<sup>2</sup> para mujeres con peso normal y con IMC  $\geq$ 30 kg/m<sup>2</sup> para mujeres con obesidad.
- II.** Que acepten participar en el estudio y firmen una carta de consentimiento informado.

## **10. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- I.** Mujeres con cáncer de mama que hayan recibido previamente tratamiento con quimioterapia.
- II.** Antecedente de cualquier tipo de neoplasia.
- III.** Síndrome metabólico.
- IV.** Procesos patológicos que condicionasen la obesidad como una enfermedad secundaria: i.e. Síndrome de Prader Willi, Síndrome de Lawrence Moon, Síndrome de Cushing, etc.

## **11. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- I.** Deseen retirar su muestra del estudio.
- II.** Que el tejido fijado en parafina no sea de calidad para llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico (IHC).

## **12. ASPECTOS ÉTICOS**

Este proyecto cuenta con la aprobación de las Comisiones de Investigación y Ética, Facultad de Medicina de la UNAM (Reg. 037-2014) y del Instituto de las Enfermedades de la Mama, FUCAM. Todas las participantes que acepten ingresar al estudio, firmarán previamente una carta de consentimiento informado que permitirá disponer de la información y las muestras de sangre, así como una muestra de tejido tumoral embebido en un bloque de parafina (carta de consentimiento ANEXO A).

La forma de consentimiento informado se estructuró acorde con las disposiciones de la Secretaría de Salud en materia de investigación en humanos.

Asimismo, para conservar la privacidad y confidencialidad de los datos obtenidos en el cuestionario que se aplicará, así como los datos obtenidos del estudio, se utilizarán la base de datos, números de folio para identificar a las diversas mujeres participantes en el proyecto y de esa forma conservar el anonimato. De igual forma, todos los cuestionarios y las tablas de resultados que se deriven de este proyecto serán almacenados bajo llave en un archivero exclusivo para este proyecto, el cual será manejado por la investigadora responsable.

Los riesgos implícitos en la toma de las muestras de sangre, mismas que se solicitarán para la obtención del plasma, son considerados mínimos.

## **13. METODOLOGÍA**

### **13.1 CONCENTRACIONES SÉRICAS DE ADIPONECTINA**

Las concentraciones séricas de la adiponectina se cuantificaron a partir de la muestra de sangre (5mL) obtenida de las mujeres con CaM no hereditario, utilizando un estuche comercial de KIT-ELISA humano (eBioscience, Quantikine ELISA Vers.2; BMS2032/2), siguiendo las indicaciones del proveedor.

El kit de ELISA que fue utilizado es un método inmunoenzimático directo tipo sandwich. Los pocillos de la policubeta estaban recubiertos con el anticuerpo de humano anti-adiponectina que actuó como anticuerpo de captura. La muestra sérica de cada paciente (dilución 1:3500) se incubó en cada uno de los pocillos por duplicado. El material no unido (anticuerpo-antígeno) se eliminó mediante los lavados. La absorbancia se leyó a 450nm en un lector de placas (BIO-RAD iMark).

### **13.2 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO (IHC)**

Se hicieron cortes a partir del tejido tumoral embebido en parafina a 2 micras. Las laminillas fijadas se desparafinaron en un horno a 60<sup>o</sup>C (20 minutos), y después se lavaron en xilol y en alcoholes a diferentes porcentajes. La recuperación antigénica se hizo mediante la solución de citratos (Inmuno/DNA Retriever Bio SB). Se utilizó una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y metanol, para desenmascarar los antígenos y eliminar la peroxidasa endógena. Luego, las laminillas se incubaron por 24 horas con los anticuerpos y diluciones correspondientes para cada caso (para adiponectina (1µg/200µL ó 1:200): anticuerpo 19F1 (Abcam ab22554, Cambridge, UK); para ADIPOR1 (1µg/400µL ó 1:400): anticuerpo policlonal (Abcam, Cambridge,UK), y para ADIPOR2 (1µg/200µL ó 1:200): anticuerpo policlonal (374-386) (Phoenix Pharmaceuticals, Inc; H-001-23)). Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anti-mouse IgG Biotin (escience, 13-4015), anti-rabbit IgG Biotin (Jackson ImmunoResearch, 111-065-003), ambos en una dilución 1:100. La detección de la reacción antígeno-anticuerpo se hizo mediante con el complejo avidina-biotina peroxidasa (Sistema de tinción ABC) y diaminobencidina (DAB); todas las laminillas se contratiñeron con hematoxilina (ANEXO B).

La expresión de la adiponectina y sus receptores (ADIPOR1 y ADIPOR2) se analizaron por microscopía de luz en 30 campos de secciones diferentes. El porcentaje del área de tinción positiva se obtuvo a partir de 30 fotografías que se tomaron mediante los resultados de las IHC para cada muestra del tejido tumoral mamario: 10 para la zona 1 (adipocitos), 10 para la zona 2 (carcinoma) y 10 para la zona 3 (infiltración linfocitaria); las cuales son representativas de toda el área del tejido tumoral mamario. Las imágenes fueron cuantificadas mediante el software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health; Halberg y cols., 2009).

## **14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos de la población del estudio se presentan como la media más menos desviación estándar ( $\bar{x} \pm DES$ ) para las variables cuantitativas, y frecuencias relativas y absolutas para las variables cualitativas.

El análisis estadístico para la comparación de medias para cada grupo (IMC normal vs IMC de obesidad) se hizo mediante la prueba de *t de Student* a partir de los datos obtenidos del porcentaje del área promedio de tinción positiva para adiponectina y sus receptores (ADIPOR1 y ADIPOR2), así como también a partir de las concentraciones séricas de adiponectina. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como diferencia significativa.

El paquete estadístico utilizado fue el software SPSS 25.0 (IBM Statistics).

## 15. RESULTADOS

### 15.1 Generalidades

Se reclutaron del Instituto de Enfermedades de la Mama (FUCAM) 50 mujeres con cáncer de mama, de las cuales 25 presentan un IMC normal (20– 24.9 kg/m<sup>2</sup>), y 25 mujeres con un IMC de obesidad ( $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), y todas ellas cumplieron con los criterios de inclusión. En la tabla 9 se muestran los parámetros clínico-patológicos de las mujeres con CaM según su IMC (normal y obesidad). Las pacientes presentan un diagnóstico patológico de carcinoma ductal infiltrante, con predominio de un tamaño de tumor  $\leq 2$ , y estadio II, así como presencia de receptor a estrógenos y progesterona positivos, HER2 negativo y un porcentaje de Ki67 positivo.

**Tabla 9. Parámetros clínico-patológicos en mujeres con CaM.**

Mujeres	Normal (IMC 20-24.9)	Obesidad (IMC $\geq 30$ )
<b>N (50)</b>	25	25
<b>*Edad (años)</b>	58.62 $\pm$ 10.17	54.1 $\pm$ 6.64
<b>Tamaño tumor n (%)</b>		
<2 cm	13 (52,0)	14 (56,0)
$\geq 2$ cm	12 (48,0)	11 (44,0)
<b>Estadio n (%)</b>		
I	10 (40,0)	10 (40,0)
II	15 (60,0)	13 (52,0)
III	0	2 (8,0)
<b>RE n (%)</b>		
Positivo	19 (76,0)	23 (92,0)
Negativo	6 (24,0)	2 (8,0)
<b>RP n (%)</b>		
Positivo	15 (60,0)	22 (88,0)
Negativo	10 (40,0)	3 (12,0)
<b>HER2 n (%)</b>		
Positivo	2 (8,0)	3 (12,0)
Negativo	23 (92,0)	22 (88,0)
<b>Ki67 n (%)</b>		
Positivo	23 (92,0)	24 (96,0)
Negativo	2 (8,0)	1 (4,0)

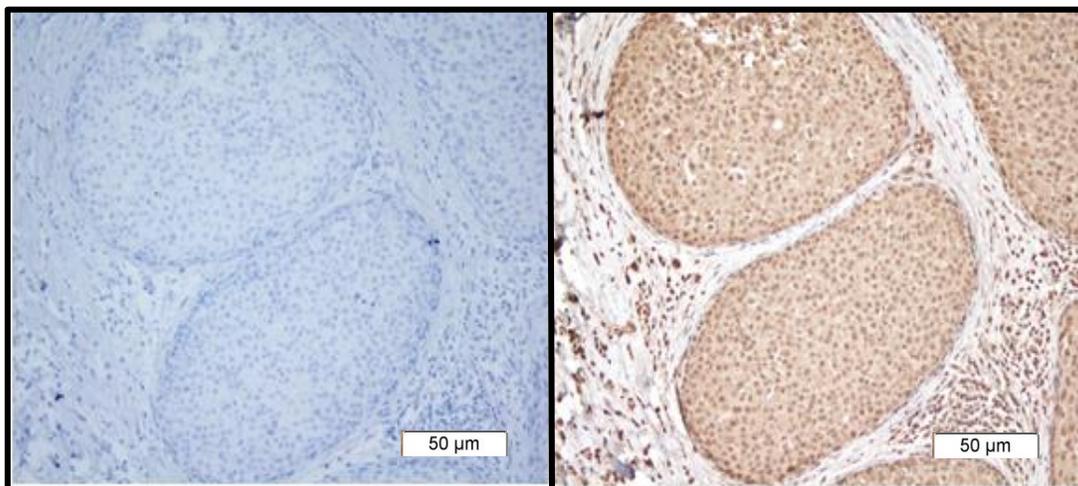
N= número de mujeres; RE= receptor a estrógenos; RP= receptor progesterona

\*Media  $\pm$  DES;  $p < 0.05$

## 15.2 INMUNOHISTOQUÍMICA: ADIPONECTINA

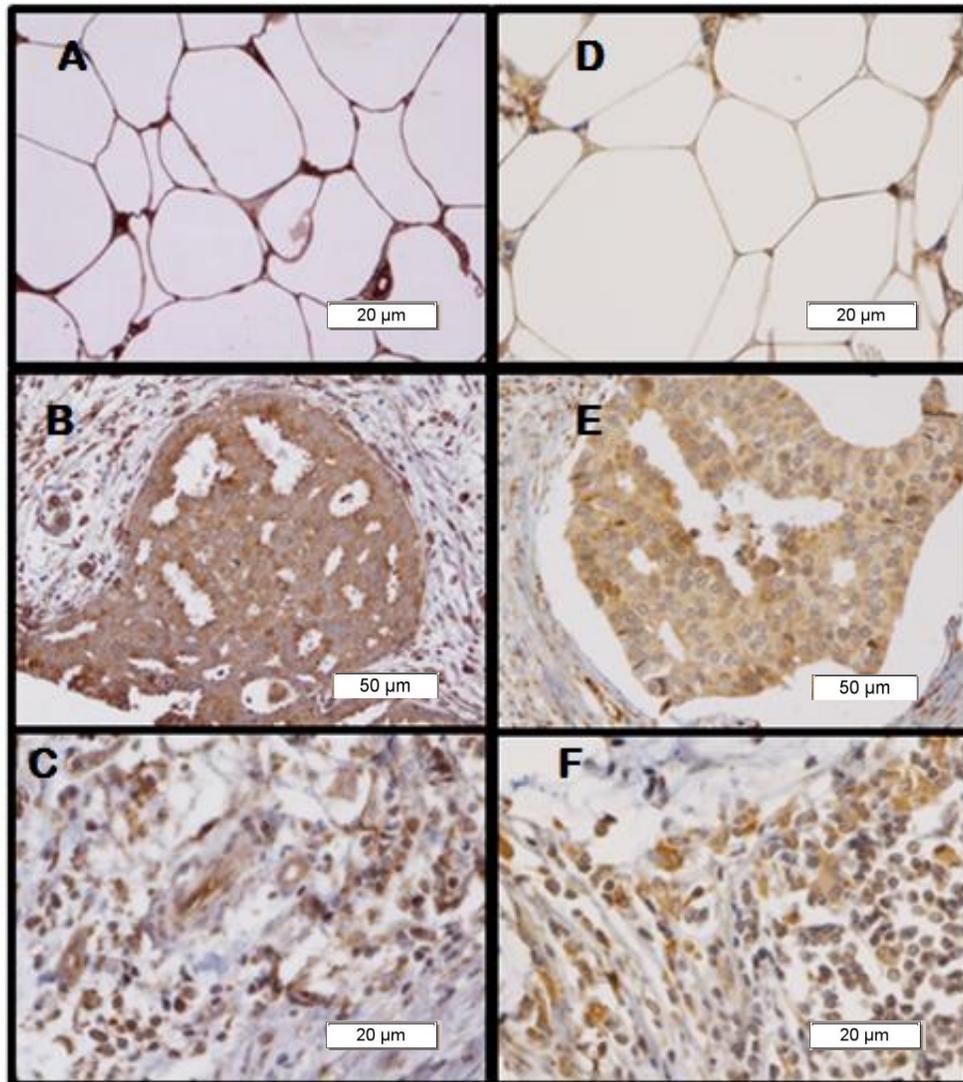
Se procesaron 50 muestras, 25 con IMC normal y 25 con un IMC de obesidad mediante la técnica de inmunohistoquímica establecida (ANEXO B), a partir de la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica para el anticuerpo de adiponectina que se muestra en el ANEXO 1, se determinó que la dilución óptima para el ensayo para adiponectina fue  $1\mu\text{g}/200\mu\text{L}$ , mientras que la dilución del anticuerpo secundario anti-mouse IgG Biotin utilizada fue 1:100.

En la Figura 9 se observan las imágenes más representativas del Positivo y del Negativo de una misma zona del tejido tumoral (carcinoma) para comprobar la especificidad del anticuerpo primario en las muestras procesadas.



**Figura 9. IHC: Tejido tumoral mamario (20X) con marca antigénica negativa (a la izquierda) y positiva a adiponectina (a la derecha).**

Por otro lado en la Figura 10 se observan las imágenes más representativas de la expresión de Adiponectina en las 3 diferentes zonas cuantificadas para ambos grupos: IMC normal vs IMC de obesidad.



**Figura 10. Inmunohistoquímica: expresión de Adiponectina en tejido tumoral mamario**  
A), B), C), pacientes con IMC 20-24.9 kg/m<sup>2</sup>; D), E) y F) pacientes con IMC ≥30 kg/m<sup>2</sup>.  
A) y D) pertenecen a la zona 1 (40X); B) y E) pertenecen a la zona 2 (20X); C) y F) pertenecen a la zona 3 (40X).  
Se observa el área de tinción positiva para Adiponectina (café) en las tres diferentes zonas cuantificadas en las mujeres que tienen un IMC normal (izquierda), respecto a las mujeres con obesidad (derecha).

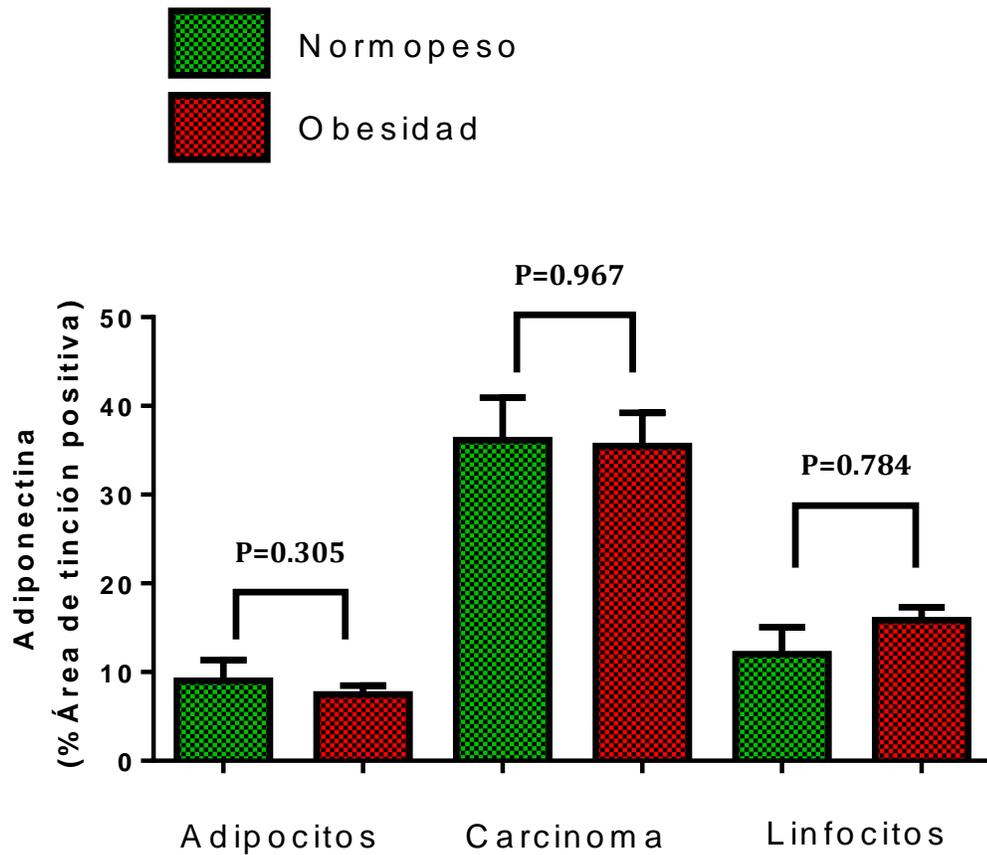
**Tabla 10. Porcentaje de área de tinción positiva para adiponectina en mujeres con cáncer de mama.**

<b>Mujeres con CaM N=50</b>		<b>Normal (IMC 20-24.9) N=25</b>	<b>Obesidad (IMC ≥30) N=25</b>
<b>%Área positiva para Adiponectina</b>	<b>Tejido adiposo</b>	9.03 ± 3.59	7.87 ± 3.05
	<b>Carcinoma</b>	38.29 ± 9.70	34.48 ± 8.20
	<b>Infiltrado linfocitario</b>	14.56 ± 5.91	16.05 ± 3.87

N=número de mujeres

% Área de tinción positiva expresada como media ± DES

En la Tabla 10 y en la Figura 11, se compara el porcentaje del área promedio de tinción positiva para adiponectina en cada zona cuantificada de las 50 muestras procesadas. Hasta el momento no se han encontrado diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje del área de tinción positiva para adiponectina entre el grupo de IMC normal (N=25) vs IMC de obesidad (N=25) en las tres diferentes áreas: adipocitos, carcinoma e infiltración linfocitaria, ( $P=0.305$ ;  $P=0.967$ ;  $P=0.784$ ; respectivamente).

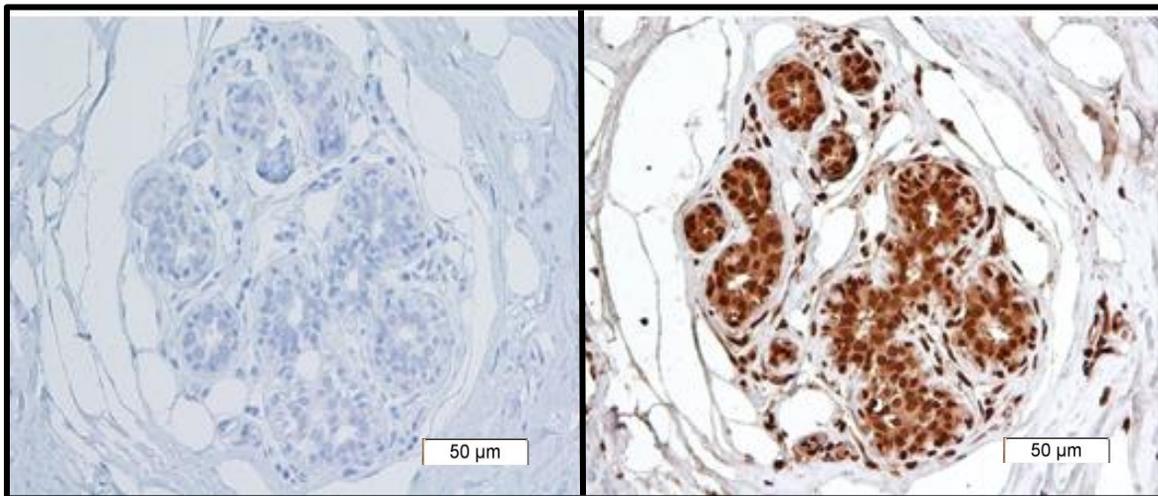


**Figura 11.** Porcentaje de área de tinción positiva para adiponectina entre pacientes con un IMC normal contra pacientes con un IMC de obesidad. No hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambos grupos para las tres zonas analizadas.

### 15.3 INMUNOHISTOQUÍMICA: ADIPOR1

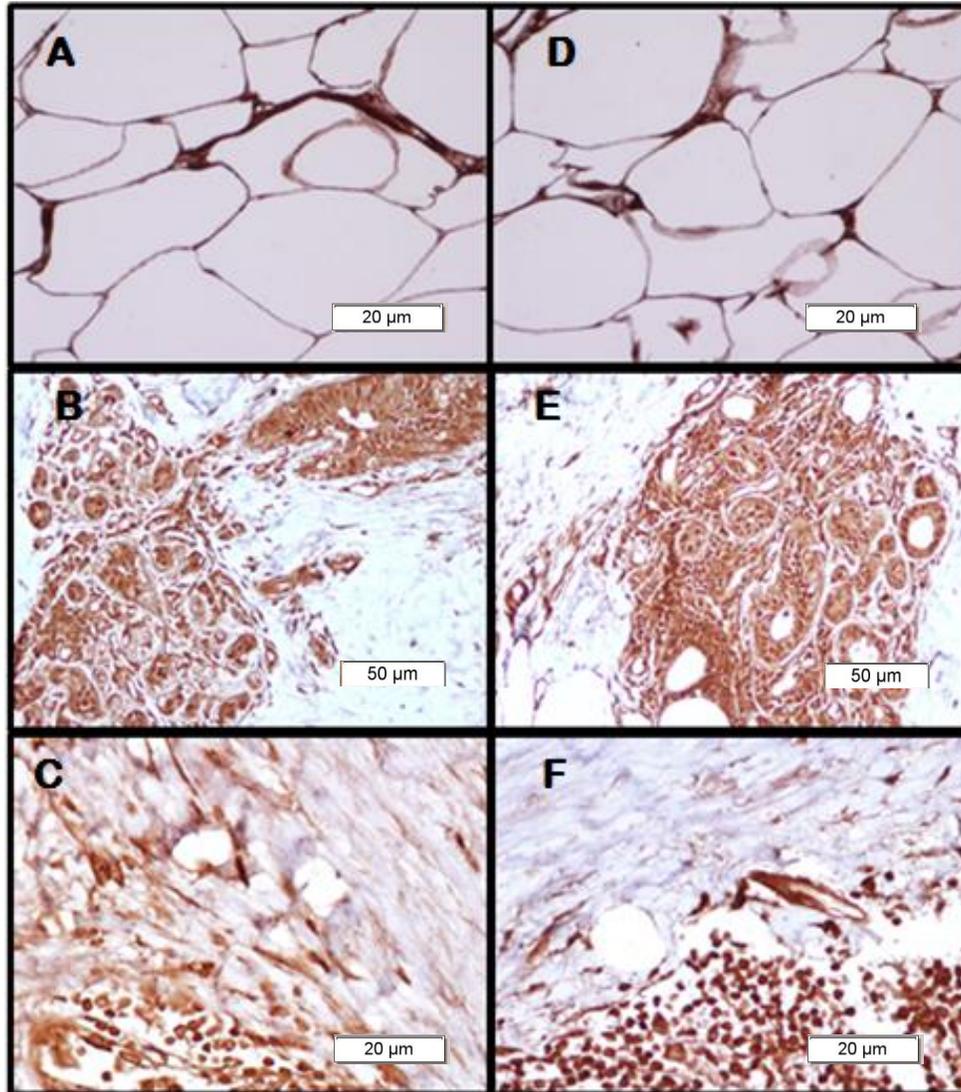
Se determinó que la dilución óptima para el anticuerpo anti-ADIPOR1 en el ensayo fue de:  $1\mu\text{g}/400\mu\text{L}$ . La dilución del anticuerpo secundario anti-rabbit IgG Biotin utilizada fue de 1:100. El grosor de los cortes del bloque de tejido tumoral embebido en parafina fueron a 2 micras.

Para comprobar la especificidad del anticuerpo primario en las muestras procesadas, mediante la técnica de inmunohistoquímica establecida (ANEXO B), se tomaron las imágenes más representativas de los Positivos y Negativos de cada muestra, los cuales se muestran en la Figura 12.



**Figura 12. IHC: Tejido tumoral mamario (20X) con marca antigénica negativa (izquierda) y positiva a ADIPOR1 (derecha).**

Las imágenes de tinción positiva para la expresión de ADIPOR1 (en las 3 diferentes zonas) en mujeres con CaM con un IMC normal respecto a las mujeres con CaM con un IMC de obesidad más representativas se muestran en la Figura 13.



**Figura 13. Inmunohistoquímica: expresión de ADIPOR1 en tejido tumoral mamario. A), B), C), pacientes con IMC 20-24.9 kg/m<sup>2</sup>; D), E) y F) pacientes con IMC ≥30 kg/m<sup>2</sup>. A) y D) pertenecen a la zona 1 (40X); B) y E) pertenecen a la zona 2 (20X); C) y F) pertenecen a la zona 3 (40X). Se observa que el área de tinción positiva para ADIPOR1 (café) en la zona de carcinoma es menor en las mujeres que tienen un IMC normal (izquierda), respecto a las mujeres con obesidad (derecha).**

**Tabla 11. Porcentaje de área de tinción positiva para ADIPOR1 en mujeres con cáncer de mama.**

	<b>Mujeres con CaM N=50</b>	<b>Normal (IMC 20-24.9) N=25</b>	<b>Obesidad (IMC ≥30) N=25</b>
<b>%Área positiva para ADIPOR2</b>	<b>Tejido adiposo</b>	7.88 ± 0.86	7.68 ± 1.09
	<b>Carcinoma</b>	30.01 ± 5.76*	39.88 ± 4.57*
	<b>Infiltrado linfocitario</b>	16.24 ± 3.69	20.69 ± 4.36

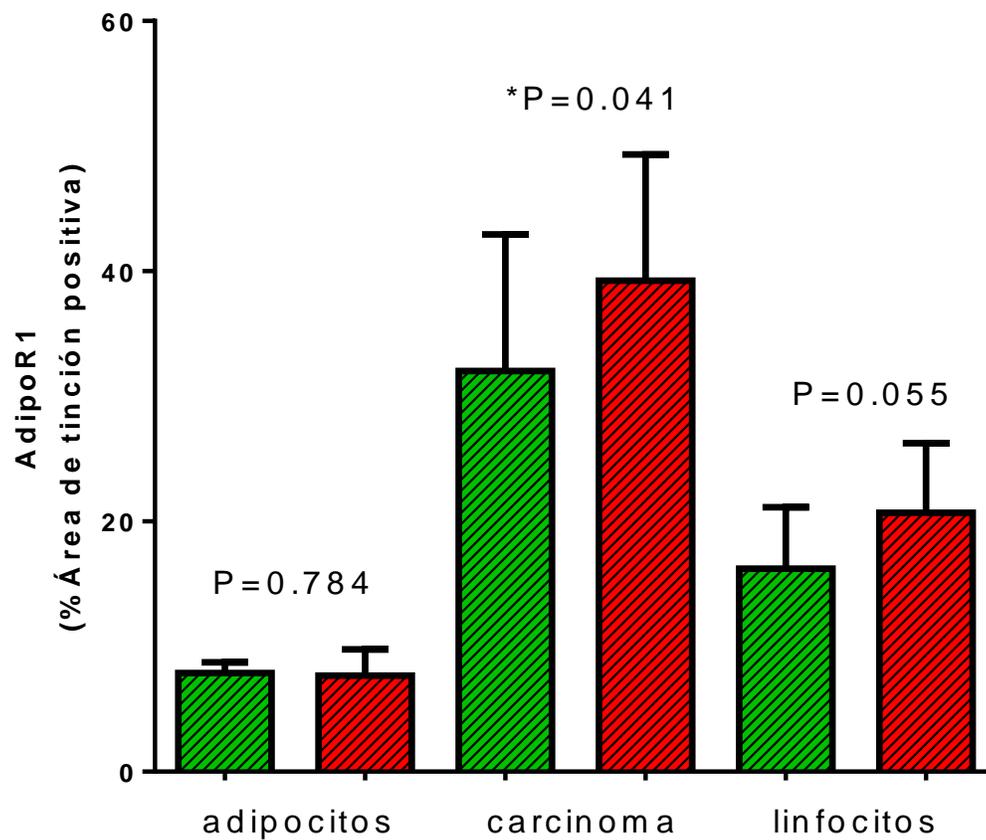
N= número de mujeres

% Área de tinción positiva expresada como media ± DES

\* P<0.05

En la tabla 11, se muestra el porcentaje del área promedio de tinción positiva para ADIPOR1. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje del área de tinción positiva para ADIPOR1 entre el grupo de IMC normal vs IMC de obesidad en las zonas de tejido adiposo e infiltración linfocitaria, (P=0.784; P=0.055; respectivamente), sin embargo, en la zona de carcinoma si se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de mujeres (P=0.041).

La comparación del porcentaje de área de tinción positiva de las 3 zonas cuantificadas se observa en la Figura 14. En éste se puede ver que las mujeres con CaM no hereditario con un IMC normal (N=25) tienen un menor porcentaje de tinción positiva para ADIPOR1 en la zona de carcinoma respecto a las mujeres con CaM con un IMC de obesidad (N=25), las cuales hasta el momento, tiene un porcentaje de tinción positiva mayor.

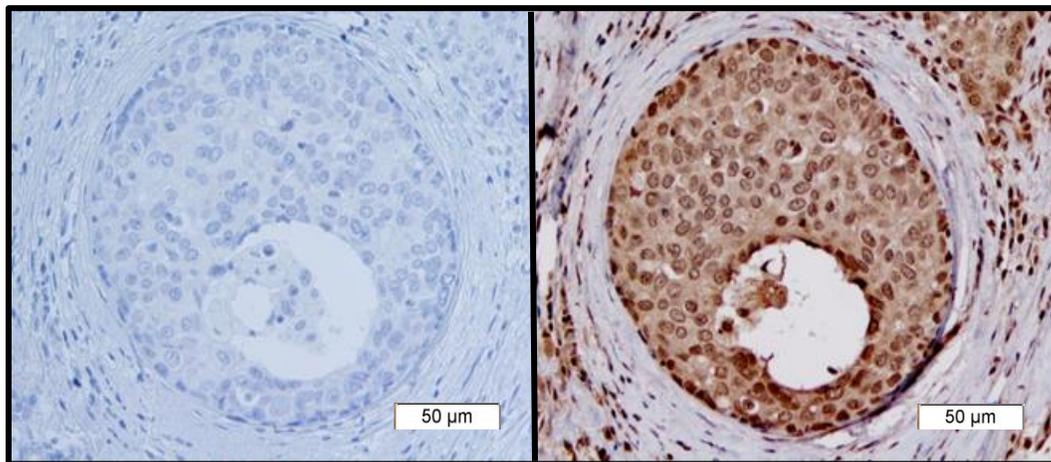


**Figura 14.** Porcentaje de área de tinción positiva para ADIPOR1 entre pacientes con un IMC normal contra pacientes con un IMC de obesidad. Se observaron diferencias significativas (\* $P < 0.05$ ) en la zona de carcinoma entre ambos grupos de mujeres con CaM, siendo menor la expresión de ADIPOR1 en el grupo con IMC normal respecto al de obesidad.

#### 15.4 INMUNOHISTOQUÍMICA: ADIPOR2

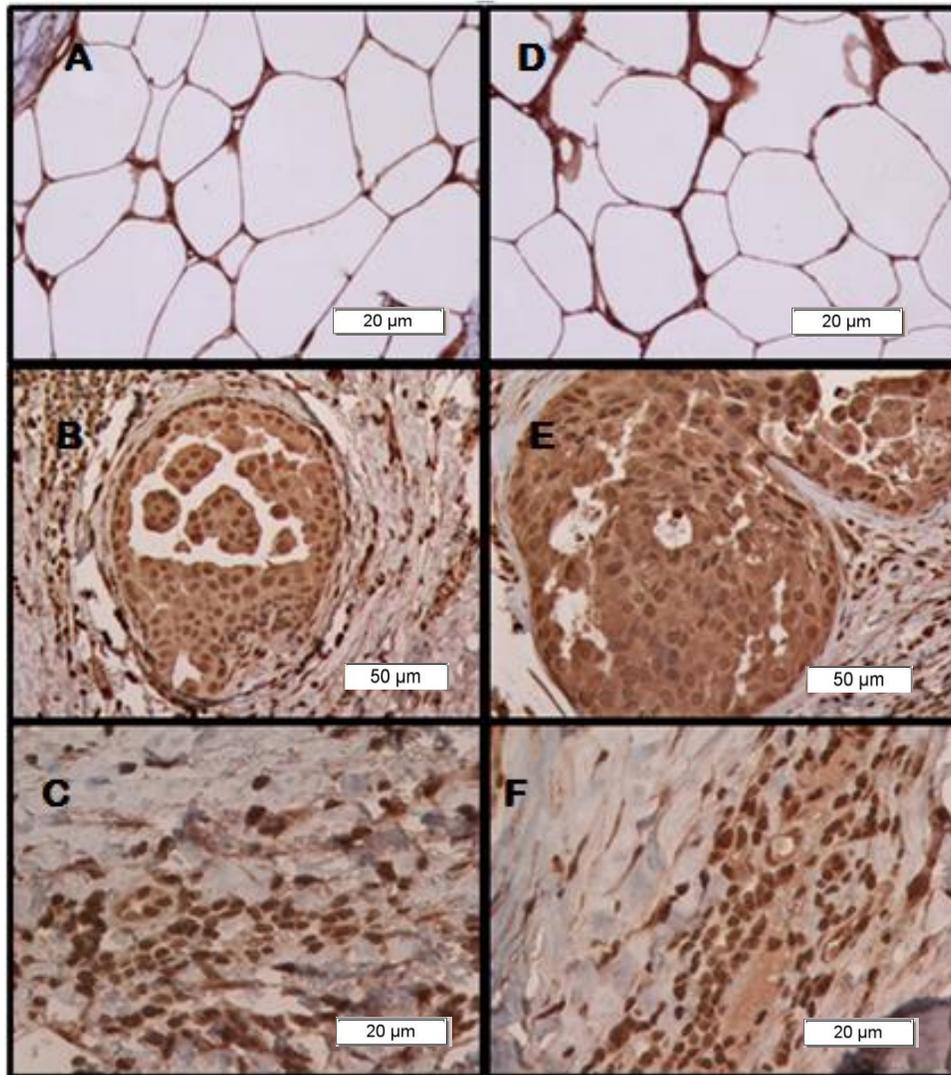
Se determinó que la dilución óptima para el anticuerpo ADIPOR2 en el ensayo fue de:  $1\mu\text{g}/200\mu\text{L}$ . La dilución del anticuerpo secundario anti-rabbit IgG Biotin utilizada fue de 1:100. Los cortes del bloque de tejido tumoral embebido en parafina fueron de 2 micras.

Para comprobar la especificidad del anticuerpo primario en las muestras procesadas, se tomaron los Positivos y Negativos para cada muestra. En la Figura 15 se observan las imágenes más representativas del Positivo y del Negativo de una misma zona del tejido tumoral (carcinoma).



**Figura 15. IHC: Tejido tumoral mamario (20X) con marca antigénica negativa (izquierda) y positiva (derecha) a ADIPOR2.**

Las imágenes de tinción positiva para la expresión de ADIPOR2 (en las 3 diferentes zonas) en mujeres con CaM con un IMC normal respecto a las mujeres con CaM con un IMC de obesidad más representativas se muestran en la Figura 16.



**Figura 16. Inmunohistoquímica: expresión de ADIPOR2 en tejido tumoral mamario. A), B), C), pacientes con IMC 20-24.9 kg/m<sup>2</sup>; D), E) y F) pacientes con IMC ≥30 kg/m<sup>2</sup>. A) y D) pertenecen a la zona 1 (40X); B) y G) pertenecen a la zona 2 (20X); E) y F) pertenecen a la zona 3 (40X). Se observa que el área de tinción positiva para ADIPOR2 (café) en la zona de tejido adiposo es menor en las mujeres que tienen un IMC normal (izquierda), respecto a las mujeres con obesidad (derecha).**

**Tabla 12. Porcentaje de área de tinción positiva para ADIPOR2 en mujeres con cáncer de mama.**

<b>Mujeres con CaM N=50</b>		<b>Normal (IMC 20-24.9) N=25</b>	<b>Obesidad (IMC ≥30) N=25</b>
<b>%Área positiva para ADIPOR2</b>	<b>Tejido adiposo</b>	8.39 ± 1.78*	14.34 ± 1.46*
	<b>Carcinoma</b>	41.47 ± 6.65	48.69 ± 4.57
	<b>Infiltrado linfocitario</b>	22.31 ± 7.73	25.73 ± 6.52

N= número de mujeres

% Área de tinción positiva expresada como media ± DES

\* P<0.05

En la tabla 12, se muestra el porcentaje del área promedio de tinción positiva para ADIPOR2. No se han encontrado diferencias significativas (P<0.05) en el porcentaje del área de tinción positiva para ADIPOR2 entre el grupo de IMC normal vs IMC de obesidad en las zonas de carcinoma e infiltración linfocitaria, (P=0.139; P=0.439; respectivamente), no obstante, en la zona de adipocitos si se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de mujeres (P=0.038).

La comparación del porcentaje de área de tinción positiva de las 3 zonas diferentes cuantificadas se muestra en el Figura 17. En éste se puede ver que las mujeres con CaM no hereditario con un IMC normal (N=25) tienen un menor porcentaje de tinción positiva para ADIPOR2 positiva en la zona de tejido adiposo respecto a las mujeres con CaM con un IMC de obesidad (N=25).

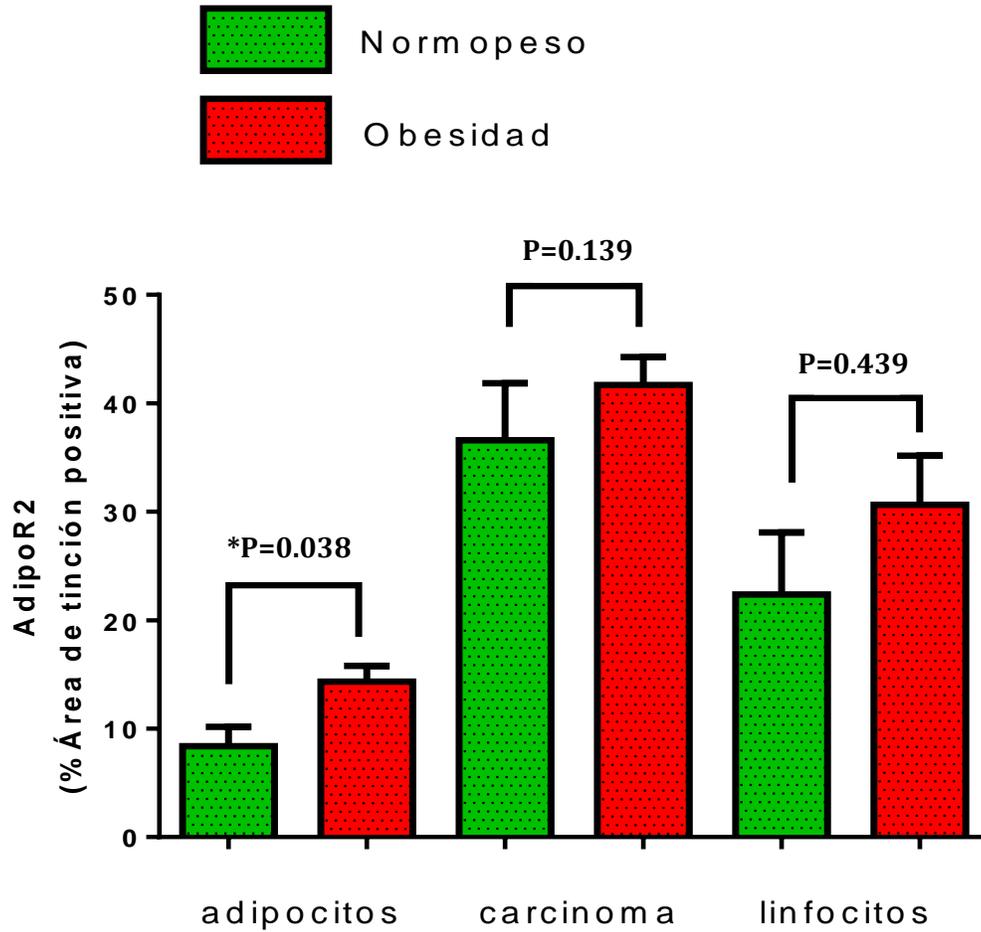


Figura 17. Porcentaje de área de tinción positiva para ADIPOR2 entre pacientes con un IMC normal contra pacientes con un IMC de obesidad. Se observaron diferencias significativas (\* $P < 0.05$ ) en la zona de adipocitos entre ambos grupos de mujeres con CaM, siendo menor la expresión de ADIPOR2 en el grupo con IMC normal respecto al de obesidad.

### 15.5 PRUEBA DE INMUNOENSAYO (ELISA)

Se obtuvieron las concentraciones séricas de adiponectina (ug/mL) en 25 muestras con IMC normal y 25 pacientes con IMC de obesidad (N=50). No se han encontrado diferencias significativas ( $P>0.05$ ), (Figura 18).

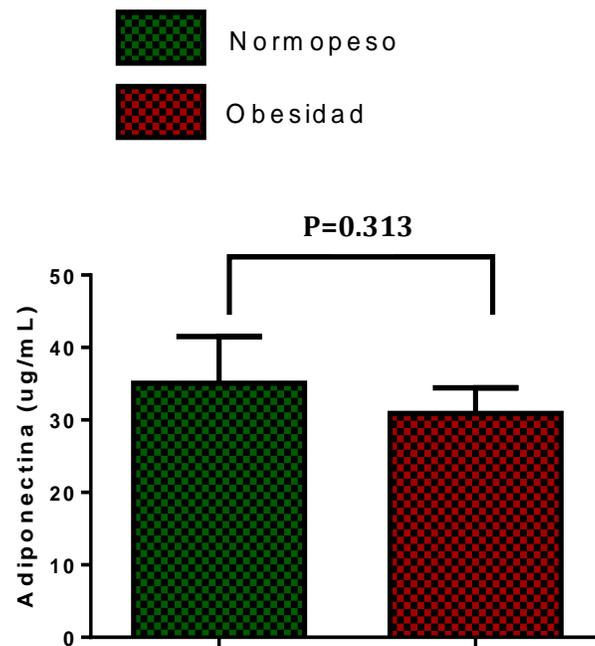


Figura 18. ELISA. Comparación de las concentraciones séricas de adiponectina entre el grupo de mujeres con CaM no hereditario con un IMC normal ( $33.74 \pm 8.73$  ug/mL) vs IMC de obesidad ( $28.85 \pm 6.71$  ug/mL). No se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ).

## 16. DISCUSIÓN

El cáncer de mama y la obesidad constituyen dos patologías de alta prevalencia en la actualidad y con un profundo impacto en la sociedad mexicana, es por ello que numerosas investigaciones han intentado establecer cuál es la relación entre ambos procesos. De tal forma que el estudiar la contribución o asociación de las adipocinas derivadas de los adipocitos con este tipo de cáncer, tal como adiponectina y sus receptores, es de suma importancia, ya que pudiesen ser útiles en la predicción del pronóstico y en la identificación de los casos con un alto riesgo de metástasis (Seruga y cols., 2008; Goldberg y Schwertfeger, 2010). Partiendo de ese punto es que en el presente estudio se analizaron la expresión de adiponectina y de sus receptores en tejido tumoral mamario de mujeres posmenopáusicas con CaM no hereditario con un IMC normal y de obesidad, mediante inmunohistoquímica (IHC), mientras que por la técnica de inmunoensayo (ELISA) se analizaron solamente las concentraciones séricas de adiponectina.

Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la adiponectina tiene un efecto inhibitorio (antineoplásico) en el crecimiento de las células de cáncer de mama (Dos Santos E y cols., 2008; Arditi JD y cols., 2007). Del mismo, se ha descrito que ésta puede suprimir el crecimiento y promover la apoptosis en líneas celulares (MCF7 y MDA-MB-231), reducir la invasión de las células de cáncer de mama, inhibir en forma directa la angiogénesis de las células endoteliales; así como también puede unirse y secuestrar varios factores de crecimiento mitogénicos selectivamente (Brakenhielm E y cols., 2004; Wang Y y cols., 2005; Dalamaga y cols., 2012; Delort L y cols., 2012).

Sin embargo, Karaduman y cols., (2007) encontraron que las pacientes con CaM presentaban una expresión de adiponectina tisular significativamente más alta en comparación de las mujeres sanas, por lo que sugirieron que este incremento de expresión de adiponectina en tejido tumoral mamario, se asociaba con un riesgo significativamente mayor de CaM. De igual forma, Young-Ju Jeong y cols., (2011) observaron una asociación entre la sobreexpresión de adiponectina y de sus receptores y la progresión e invasión en los tumores con carcinoma infiltrante en comparación con el carcinoma *in situ*. Ambos

autores sugieren que estos resultados contradictorios con lo reportado en relación a las concentraciones séricas, se debe a la asociación que existe entre la adiponectina y el estrógeno, pues esta adipocina pudiera jugar un posible papel en el riesgo de CaM alterando las concentraciones circulantes del estrógeno. Además, de que el IMC podría estar relacionado con las concentraciones de adiponectina en sangre pero no en sus niveles de expresión en tejido. Entonces, la obesidad podría aumentar el riesgo de CaM a través de un efecto mitogénico por el incremento de insulina (hiperinsulinemia), de IGF-1 y de las concentraciones de estrógenos (Mawson y cols, 2005).

En contraste a los dos estudios referidos arriba, Jardé y cols., (2008) describieron que la expresión de adiponectina fue mayor en el tejido adyacente normal que en el tejido neoplásico, y que la expresión de adiponectina en carcinoma ductal invasivo fue mayor que en carcinoma ductal *in situ*.

Se sabe que la adiponectina puede actuar sobre las células tumorales de mama directamente para disminuir la proliferación celular, aumentando la diferenciación y la apoptosis mediante AMPK/mTOR (Luo Z y cols, 2005; Sugiyama M y cols, 2009) y JNK/STAT3 (Miyazaki y cols., 2009). No obstante podría haber vías de señalización adicionales activadas por la adiponectina (además de las conocidas), por ser identificadas, que podría mediar los efectos benéficos de esta adipocina. El papel que desempeña y/o el equilibrio de cada una de estas vías de señalización, tiene una función importante en los efectos antineoplásicos, antiproliferativos y apoptóticos que desempeña la adiponectina, y es por ello que es un área activa de investigación.

En relación a nuestros resultados de la expresión de adiponectina en tejido tumoral mamario no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos de estudio; sin embargo, debido a que se trata de un estudio piloto, el tamaño de muestra por grupo (N=25) no fue suficiente para mostrar dichas diferencias, por lo que se hizo un recalcu del tamaño de muestra a partir de las desviaciones estándar de nuestros resultados, mediante el software PASS 2008 (Power Analysis and Simple Size, versión 08.0.15), utilizando la fórmula de diferencia de proporciones, con un poder del 80% y un nivel de confianza del 0.05. De este modo se obtuvo una N=80 para cada grupo (IMC normal e IMC de obesidad), este tamaño de muestra podría darnos diferencias significativas.

Con respecto a los receptores ADIPOR1 y ADIPOR2, en un estudio realizado por Pfeiler y cols. (2009), en mujeres con cáncer de mama invasivo, encontraron una correlación positiva entre la invasión tumoral con la expresión de ADIPOR2 pero no con ADIPOR1; sin embargo, observaron que este último receptor, tenía una mayor expresión en comparación con ADIPOR2, además de una fuerte asociación con insulina e IGF-1. Asimismo, otro grupo de investigación, describió una mayor expresión de ADIPOR1 en los tipos de cáncer fuertemente asociados con la obesidad, como es el carcinoma de células renales o de vejiga en comparación con los cánceres no asociados con la obesidad (p.e., el carcinoma de células escamosas de cuello uterino) (Sharon y cols., 2010).

Yamauchi y cols., (2007) demostraron que la vía AMPK es crucial para la actividad antitumoral de la adiponectina, por lo que se cree que los efectos anti-tumorales de la adiponectina están mediados en gran parte por ADIPOR1, ya que la activación de AMPK, suprime la proliferación celular, a través de diferentes mecanismos. Además, de acuerdo a los estudios realizados por Luo y cols (2005); Wang y cols (2006), encontraron que la adición de adiponectina en diferentes líneas celulares de cáncer de mama inhibe el crecimiento de las células cancerígenas, lo cual se puede explicar por la activación de la vía AMPK.

Nosotros no encontramos diferencias significativas en la expresión de ADIPOR1 en la zona que corresponde a tejido adiposo, pero si se observó una menor expresión del receptor en las mujeres con un IMC normal en las zonas de carcinoma ( $P=0.041$ ) e infiltración linfocitaria ( $P=0.055$ ), en contraste con las mujeres con un IMC de obesidad. Lo anterior, pudiera ser debido a que el receptor en las mujeres con obesidad, se está sobreexpresando para compensar los bajos niveles de expresión de adiponectina en el tejido, sin embargo, debido a que la muestra analizada era muy pequeña y que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de adiponectina en el tejido, esta hipótesis aún no es sustentable.

En cuanto a la expresión de ADIPOR2 no se encontraron diferencias significativas tanto en tejido tumoral mamario como en el infiltrado linfocitario tumoral; sin embargo, observamos que las mujeres con IMC normal, tuvieron una menor expresión de éste en la zona correspondiente a los adipocitos del tejido tumoral, en relación a la observada en las

mujeres con obesidad ( $P=0.038$ ). Por lo tanto, con base a nuestros resultados, del mismo modo que sucede con ADIPOR1, la existencia de un efecto compensatorio en las mujeres con cáncer de mama que presentan obesidad, podría estar sobreexpresando ADIPOR2 ante los bajos niveles de expresión de adiponectina, para que ésta pueda ejercer su función anti-tumoral.

Se sabe que las concentraciones de adiponectina circulante son en general más bajas en las neoplasias malignas asociadas con la obesidad (p.e el carcinoma de células renales). Por lo que cuando las concentraciones de un ligando son bajas usualmente se asocian con la sobreexpresión del receptor en cuestión. Entonces, partiendo de ese hecho, Sharon y cols., (2010) mencionan que el establecimiento de las concentraciones séricas y la expresión de adiponectina son bajas y la existencia de una sobre-expresión de los receptores de ésta, puede estar regulada positivamente de una manera compensatoria, lo cual es observado frecuentemente en muchos ejes hormonales. Por ejemplo, en el hipotiroidismo existe un mecanismo compensatorio, en el cual la disminución de la producción de la tiroxina libre provoca un aumento en la secreción de la hormona estimulante de la tiroides por la glándula pituitaria, la cual estimula la hipertrofia y la hiperplasia de la glándula tiroides y la actividad 5'-deiodinasa, aumentando de este modo la producción de triyodotironina (Yen S y cols 2001).

Lo anterior pudiera explicar por qué nosotros hayamos una expresión de ADIPOR2 en la zona 1 que pertenece a la zona de adipocitos diferente entre ambos grupos, siendo menor en las mujeres posmenopáusicas con CaM con un IMC normal respecto a las mujeres con obesidad, lo cual reafirma el punto anterior. Por lo tanto, la presencia de una mayor adiposidad que modifica las diferentes vías de señalización en las que participa adiponectina podría tener una mayor implicación en las mujeres con obesidad, ya que una disminución o desregulación de la expresión de adiponectina a nivel del tejido dificultaría el poder realizar su efecto antiproliferativo y antiangiogenico (Taliaferro-Smith y cols., 2009), los cuales son muy importantes en el proceso de invasión y metástasis del CaM.

En cuanto al análisis de las concentraciones séricas de adiponectina es importante referir que la adiponectina sérica está regulada por varios factores, tales como patologías (resistencia a la insulina, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, hipertensión,

enfermedades cardiovasculares y en diversos tipos de cáncer), factores genéticos, perfiles hormonales, inflamación, hábitos alimenticios y parámetros farmacológicos (fibratos, estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, tiazolidinedionas, etc), (Dalamataga y cols, 2012). Nosotros encontramos una tendencia en las concentraciones séricas que fueron inversamente proporcionales al IMC, sin embargo el rango promedio de las concentraciones fueron mayores a lo reportado (25-30µg/mL) en otros estudios. Lo anterior pudiera ser secundario a la sensibilidad del kit de medición y/o diferencias metodológicas. Por ejemplo, en un estudio se encontró que sujetos con obesidad tuvieron concentraciones medias de adiponectina plasmática de  $3.7 \pm 3.2$  µg/mL, en comparación con sujetos sin obesidad ( $8.9 \pm 5.4$  µg/mL) (Arita Y y cols., 1999). Del mismo modo, en otro estudio, los valores percentiles 25, 50 y 75 para las concentraciones séricas de esta adipocina en mujeres sanas fueron 9.97, 13.21 y 17.68 µg/mL, respectivamente (Petridou E y cols., 2003). Aunque se ha asumido, de acuerdo a múltiples estudios, que las concentraciones séricas de esta adipocina no está correlacionada con su expresión en el tejido (Arita Y y cols., 1999; Mantzoros C y cols., 2004; Vona-Davis L y cols., 2007).

Debido a que las adipocitocinas que circulan en sangre ejercen sus acciones biológicas sobre las células diana no sólo por los mecanismos endocrinos clásicos (Wolk, 2011), sino también a través de las vías paracrinas o autocrinas, las hormonas esteroides, la insulina, los sistemas de factores de crecimiento, y las adipocinas (como adiponectina y sus receptores) son sistemas asociados con el proceso carcinogénico. Por lo tanto, la comprensión de las asociaciones entre el sobrepeso, la obesidad y una amplia variedad de tipos de cáncer, así como los mecanismos biológicos que contribuyen a estas asociaciones, sigue siendo un área de investigación en evolución y actualmente muy activa.

La importancia fisiopatológica de adiponectina y/o sus receptores y su potencial valor predictivo en la evaluación del riesgo de neoplasias malignas, la recaída y los resultados del tratamiento en cánceres relacionados con la obesidad merecen investigaciones adicionales. Por lo tanto, son necesarios más estudios para dilucidar los efectos directos de la adiponectina para prevenir la carcinogénesis y/o la progresión tumoral en mujeres posmenopáusicas con CaM no hereditario, así como su posible uso clínico.

## 17. CONCLUSIONES

- 1) No se encontraron diferencias significativas en la expresión de adiponectina en ninguno de las zonas estudiadas de tejido tumoral mamario.
- 2) Se observó una mayor expresión de ADIPOR1 solo en la zona que corresponde a carcinoma del tejido tumoral, mientras que por otro lado, la expresión de ADIPOR2 fue mayor en la zona de tejido adiposo, en las mujeres postmenopáusicas con CaM no hereditario con obesidad.
- 3) No hubo diferencias significativas en las concentraciones séricas en las mujeres postmenopáusicas con CaM no hereditario con un IMC de obesidad en comparación las mujeres con normopeso. El rango promedio de las concentraciones séricas de adiponectina fue mayor a lo reportado con anterioridad.
- 4) Este estudio contribuye en la promoción de nuevas líneas de investigación y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para combatir el cáncer de mama.

## 18. PERSPECTIVAS

- I. La identificación de los pacientes con CaM con mayor riesgo en desarrollar complicaciones, así como de su prevención y tratamiento, constituyen aspectos de mayor relevancia, y es por eso que son necesarios mayores estudios enfocados en la expresión de adiponectina y ADIPOR1 y ADIPOR2 en tejido tumoral mamario, en particular para las mujeres con sobrepeso u obesidad, ya que esto podría permitir dilucidar por completo su función.
- II. Para conocer lo anterior, y continuar este proyecto para el Doctorado se propone incluir al sub-grupo de sobrepeso, debido a que éste, se ha incrementado en forma importante, ya que la prevalencia de sobrepeso en las mujeres fue del 35.5% en el 2012 y aumentó al 37.0% en el 2016 (ENSANUT MC, 2016). De tal forma, que sería interesante conocer, si el grupo de mujeres con CaM y sobrepeso presentan un comportamiento de expresión de adiponectina y de sus receptores en el tejido tumoral y especialmente si su pronóstico es similar a las mujeres con obesidad y CaM. Además se aumentará la *n* a 80 muestras para cada uno de los grupos del estudio (N=240), y se les dará un seguimiento a las mujeres por 3 años, los cuales nos permitirá documentar las recurrencias tempranas, pues diversos estudios han sugerido que las mujeres con obesidad al momento del diagnóstico de CaM, se asocia con un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad, muerte por este cáncer y mortalidad.
- III. Por otro parte con el fin de aumentar el panel de posibles marcadores pronósticos de CaM, se propone estudiar también al factor de transcripción Nrf2, ya que dicho factor regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (Antioxidant Response Element), la cual puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos; por lo tanto, es un importante activador transcripcional implicado en los mecanismos de defensa celular contra el estrés oxidativo. Asimismo se cuantificara la capacidad antioxidante total en suero de cada paciente con el propósito de identificar quimioresistencia.

## 19. REFERENCIAS

1. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav* 2004; 81:223-241
2. Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF $\kappa$ B activation and IL-6 production and increases PPAR  $\gamma$  2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R1220–R1225
3. Al Khaldi RM, Al Mulla F, Al Awadhi S, Kapila K, Mojiminiyi OA. Associations of single nucleotide polymorphisms in the adiponectin gene with adiponectin levels and cardio-metabolic risk factors in patients with cancer. *Dis Markers* 2011; 30: 197-212
4. Arditi JD, Venihaki M, Karalis KP, Chrousos GP. Antiproliferative effect of adiponectin on MCF7 breast cancer cells: a potential hormonal link between obesity and cancer. *Horm Metab Res* 2007;39:9-13
5. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83
6. Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:137- 45
7. Banga A, Unal R, Tripathi P, Pokrovskaya I, Owens RJ, Kern PA, Ranganathan G. Adiponectin translation is increased by the PPAR agonists pioglitazone and omega-3 fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:E480–E489
8. Barresi V, Grosso M, Giuffre G et al. The expression of adiponectin receptors Adipo-R1 and Adipo-R2 is associated with an intestinal histotype and longer survival in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 2009; 62:705–709
9. Beltowski J. Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003; 9:55RA-61.
10. Beltowski J, Jamroz-Wisniewska A, Widomska S. Adiponectin and its role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008; 8: 7-46
11. Beltowski J. Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003; 9: 55RA-61
12. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957; 11(3):359-377
13. Bloom ND, Tobin EH, Schreiberman B, Degenshein GA. The role of progesterone receptors in the management of advanced breast cancer. *Cancer* 1980;45:2992-97
14. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 2000; 19: 2474–2488

15. Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 2476–2481
16. Candanedo González F, Pérez-Salazar E. El papel de la progesterona en cáncer de mama. *GAMO*. 2012; 11(3):182-188
17. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003; 26: 2442-50
18. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 579–591
19. Cereijo R, Giralt M y Villarroya F. Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans *Ann Med*. 2014; 18: 1-9.
20. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*. 2003; 46: 459–469
21. Cohen DA. Obesity and the built environment: changes in environmental cues cause energy imbalances. *Int J Obes* 2008; Suppl 7:S137-142
22. Colditz GA, Baer HJ, Tamimi RM. Breast cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2006
23. Dai X, Li T, Bai Z, *et al*. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*. 2015;5 (10):2929-2943.
24. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev* 2012; 33: 547– 594
25. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000; 103: 239–252
26. Delort L, Jardé T, Dubois V, Vasson MP, Caldefie-Chézet F. New insights into anticarcinogenic properties of adiponectin: a potential therapeutic approach in breast cancer? *Vitam Horm* 2012; 90: 397–417
27. Dos Santos E, Benaitreau D, Dieudonne MN, Leneveu MC, Serazin V, Giudicelli Y, *et al*. Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. *Oncol Rep* 2008; 20:971-7
28. Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992; 339:1-15

29. Early Breast Cancer Trialists's Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;351:1451-67
30. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19:403-410
31. Fabian CJ. Adiponectin: a risk biomarker and attractive target for chemoprevention. *Journal of clinical oncology*. 2011; 151-152
32. Fisher B, Dignam J, Bryant J, DeCillis A, Wickerham DL, Wolmark N et al. Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1529-42
33. Fisher FM, Trujillo ME, Hanif W, Barnett AH, McTernan PG, Scherer PE, Kumar S. Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia*. 2005; 48:1084-1087
34. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 2005-2010
35. Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 2563-2568
36. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, BeldaIniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004; 30:193-204
37. Gottardi O, Baiocchi C, Ferrari M, Franchi L, Gambacorta M, Landonio G et al. Correlation between histochemically assessed hormonal receptor content and clinical course in breast cancer. Presentation of 1,005 cases. *Oncol*. 1991;48:221-5
38. Grossmann ME, Cleary MP. The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis - focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie* 2012; 94:2164-2171
39. Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 356:487-493
40. Hammond ME, Hayes DF, Mitch-Dowsett D, Craig A, Hgerty KL, Sunil-Badve, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010; 28(16):2784-95
41. Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2002; 51:536-40

42. Haupt B, Ro JY, Schwartz MR. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(1):130-133
43. Havel PJ. Update on adipocyte hormones. Regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004; 53:S143-51
44. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998;339:974-84
45. Horton J. Her2 and trastuzumab in breast cancer. *Cancer Control* 2001 Jan-Feb;8(1):103-10
46. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer.* 2013; 12:86
47. Howat HM, Harris JM, Swindell R, Barnes DM. The effect of oestrogen and progesterone receptors on recurrence and survival in patients with carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1985;51:263-70
48. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996; 271:10697-703
49. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 10308–10313
50. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001; 38:103-113
51. Imagawa A, Funahashi T, Nakamura T, Noriwaki M, Tanaka S, Hishizawa H, et al. Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25:1665-6
52. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 2003; 115:577–590
53. Jardé T, Caldefie-Chézet F, Damez M, Mishellany F, Perrone D, PenaultLlorca F, et al. Adiponectin and leptin expression in primary ductal breast cancer and in adjacent healthy epithelial and myoepithelial tissue. *Histopathology* 2008;53:484-7
54. Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grénman S, et al. Amplification and deletion of topoisomerase II alpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 2000 Mar; 156(3):839-847. 26.
55. Jemal A, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90
56. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26:439-451

57. Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Hidalgo J, Saha AK, Pedersen BK, Ruderman NB. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 320: 449–454
58. Khan S, Shukla S, Sinha S, Meeran SM. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: Therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013; 24:503-513
59. Körner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, Kelesidis I, Williams CJ, Kaprara A, Bullen J, Neuwirth A, Tseleni S, Mitsiades N, Kiess W, Mantzoros CS. Total and high molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:1041–1048
60. Lavasani MA, Moinfar F. Molecular classification of breast cancer with particular emphasis on “basal like” carcinoma: a critical review. *J Biophotonics*. 2014; 5(4):345-66
61. Li G, Cong L, Gasser J, Zhao J, Chen K, Li F. Mechanisms underlying the anti-proliferative actions of adiponectin in human breast cancer cells, MCF7- dependency on the cAMP/protein kinase-A pathway. *Nutr Cancer* 2011; 63:80-88
62. Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2005; 26: 69–76
63. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagenlike factor, apM1 (Adipose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221:286-9
64. Maki DD, Grossman RI. Patterns of disease spread in metastatic breast carcinoma: influence of estrogen and progesterone receptor status. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;21:1064-6
65. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010; 10(10):955-960
66. Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, Papadiamantis Y, Markopoulos C, Spanos E, Chrousos G, Trichopoulos D. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 1102–1107
67. Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, et al. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1102-7
68. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:29-33
69. Mawson A, Lai A, Carroll JS, Sergio CM, Mitchell CJ, Sarcevic B. Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005; 229: 161-173

70. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER-2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 2000;182(2):150-62
71. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000 Dec; 19(56):6550-65.
72. Mincey BA. Genetics and the management of women at high risk for breast cancer. *Oncologist* 2003; 8:466-473
73. Miyazaki T, Bub JD, Uzuki M, Iwamoto Y. Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333: 79-87
74. Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y, Noguchi S. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 5699-5704
75. Molica S, Digiesi G, Vacca A, Mirabelli R, Todoerti K, Battaglia C, Morabito F, Neri A, Ribatti D 2009 Does adiponectin act as an antiangiogenic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia? *Adv Hematol.* 2009: 287974
76. Navarro MA, Díez Gibert O, Fernández-Montolí ME, Rosel P, Bonnin MR. El cociente receptores de estrógenos/receptores de progesterona como índice de actividad transcripcional de los receptores de estrógenos en el cáncer de mama. *Med Clin* 1995;104:681-2.
77. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita T. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 1996;20:803-12
78. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001;3(6):385-9
79. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, y cols. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279:1304-1309
80. Ouchi N, Shibata R, Walsh K. AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res.* 2005; 96: 838-846
81. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003;14: 561-6
82. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedionemediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 2004; 279: 12152-12162

83. Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 2005; 23(11):2556-68
84. Pérez-Sánchez VM, Vela-Chávez TA, Tiscareño-Mora A. Diagnóstico histopatológico y factores pronóstico en cáncer infiltrante de glándula mamaria. *Cancerología*. 2008; 3:7-17
85. Perou CM, Sorlie T, Eidsen MB. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Letters to nature* 2000; 406: 747-752.
86. Petridou E, Mantzoros C, Dessypris N et al. Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer: a case-control study in Greece. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:993-997
87. Pfeiler G, Treeck O, Wenzel G et al. Influence of insulin resistance on adiponectin receptor expression in breast cancer. *Maturitas* 2009; 63:253-256
88. Pharoah PD, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BA. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:2796-2803
89. Phillips SA, Ciaraldi TP, Kong APS, Bandukwala R, Aroda V, Carter L, et al. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* 2003; 52:667-74
90. Poher AL, Altirriba J, Veyrat-Durebex C y Rohner-Jeanrenaud F. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance *Front Physiol*. 2015
91. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120(2):293-308
92. Redma López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 1768-1773
93. Rita Nahta. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncology*. 2012; 2012:428062
94. Ring AE, Smith IE, Ashley S, Fulford LG, Lakhani SR. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 2004; 91: 2012-7
95. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003; 8(4):307-25
96. Rosen ED y Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006; 444: 847-53

97. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K *et al*. Breast molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5678-85
98. Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2005; 7(3):131-142
99. Saxena NK, Sharma D. Metastasis suppression by adiponectin: LKB1 rises up to the challenge. *Cell Adh Migr* 2010; 4:358-362
100. Sidossis L y Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2015; 125: 478-486
101. Snehalatha C, Mukesh B, Simon M, Viswanathan V, Haffner SM, Ramachandran A. Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 2003; 26:3226-9
102. Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:887-99
103. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:26746-9
104. Sharon H. Chou, Sofia Tseleni-Balafouta, Hyun Seuk Moon, John P. Chamberland, Xiaowen Liu, Nikolaos Kavantzias, Christos S. Mantzoros. Adiponectin receptor expression in human malignant tissues. *Horm Canc*. 2010; 1:136-145
105. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2010;1 (2):109-126.
106. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001 Mar 15;344(11):783-92.
107. Soutiriou C. and Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 790-800
108. SSA México. Boletín de Información Estadística. [en línea] Consultado en <http://sinais.salud.gob.mx/publicaciones/>. S. de. Salud. México, Secretaría de Salud. 2008a; No. 28
109. SSA México. Información para la rendición de cuentas. Consultado en [http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/tarjetas/Cancer\\_mama\\_y\\_cervix1.pdf](http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/tarjetas/Cancer_mama_y_cervix1.pdf). S. de Salud. México, SSA. 2008b
110. Stumvoll M, Tschritter O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser M, et al. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:37-41

111. Sugiyama M, Takahashi H, Hosono K et al. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. *Int J Oncol* 2009; 34:339–344
112. Taliaferro-Smith L, Nagalingam A, Zhong D, Zhou W, Saxena NK, Sharma D. LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2009; 28:2621-2633
113. Thor AD, Liu S, Edgerton S, Moore DII, Kasowitz KM, Benz CC, et al. Digiovanna MP activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18(18):3230-9
114. Townsend KL, Tseng YH. Brown adipose tissue. Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte* 2012; 1: 13-24.
115. Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin—journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005; 257:167–175
116. Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:189-206
117. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC, American Institute for Cancer Research, 1997
118. Wang Y, Lam JB, Lam KS, Liu J, Lam MC, Hoo RL, et al. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3 $\beta$ /betacatenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res* 2006; 66:11462-11470
119. Wang Y, Lam KS, Xu JY et al. Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem* 2005; 280:18341– 18347
120. Wang Y, Lam KS, Chan L, Chan KW, Lam JB, Lam MC, Hoo RC, Mak WW, Cooper GJ, Xu A. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem*. 2006; 281:16391–16400
121. Wang YY, Lehuède C, Laurent V, Dirat B, Dauvillier S, Bochet L, et al. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett* 2012; 324:142-151
122. Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LX, Cooper GJS. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. *J Biol Chem* 2002; 277:19521-9
123. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological Types of breast cancer: How special are they? *Mol Onc*. 2010; 4(3):192-208

124. Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyren O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Adam HO. A prospective study of obesity and cancer risk. *Cancer Causes Control* 2001;12: 13–21
125. World Health Organization Guidelines for management of breast cancer. Nasr: EMRO Technical Publications Series. 2006
126. Wyatt SB, Winters KP, Dubbert PM. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Am J Med Sci*. 2006; 331:166-174
127. Xu YL, Sun Q, Shan GL, Zhang J, Liao HB, Li SY, y cols. A case-control study on risk factors of breast cancer in China. *Arch Med Science* 2012; 8:303-309. 64:391-394
128. Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, y cols. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003; 3:243-254
129. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002; 8: 1288–1295
130. Yamauchi T, Kamon J, Kaki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone Adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-6.
131. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):412-424
132. Young-Ju Jeong, Jin-Gu Bong, Sung-Hwan Park, Jung-Hye Choi, Hoon-Kyu Oh. Expression of Leptin, Leptin Receptor, Adiponectin, and Adiponectin Receptor in Ductal Carcinoma In Situ and Invasive Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2011 Jun; 14(2): 96–103
133. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ª ed. Editorial Medica Panamericana, 2001; 439-443
134. Yin N, Wang D, Zhang H, Yi X, Sun X, Shi B, y cols. Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin. *Cancer Res* 2004; 64:5870-5875
135. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-432
136. Zhang R, Wu J, Liu D, Shan H and Zhang J. Anti-inflammatory effect of full-length adiponectin and proinflammatory effect of globular adiponectin in esophageal adenocarcinoma cells. *Oncol Res* 2013; 21: 15-21
137. Zhang R, Yin X, Shi H, Wu J, Shakya P, Liu D and Zhang J: Adiponectin modulates DCA-induced inflammation via the ROS/NF-κ B signaling pathway in esophageal adenocarcinoma cells. *Dig Dis Sci* 2014; 59: 89-97.

138. Zhao HY, Zhao M, Yi TN, Zhang J. Globular adiponectin protects human umbilical vein endothelial cells against apoptosis through adiponectin receptor 1/adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway. *Chin Med J (Engl)*. 2011; 124:2540-2547
139. Zhao M, Sachs PC, Wang X, Dumur CI, Idowu MO, Robila V, y cols. Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type. *Cancer Biol Ther* 2012; 13:782-792

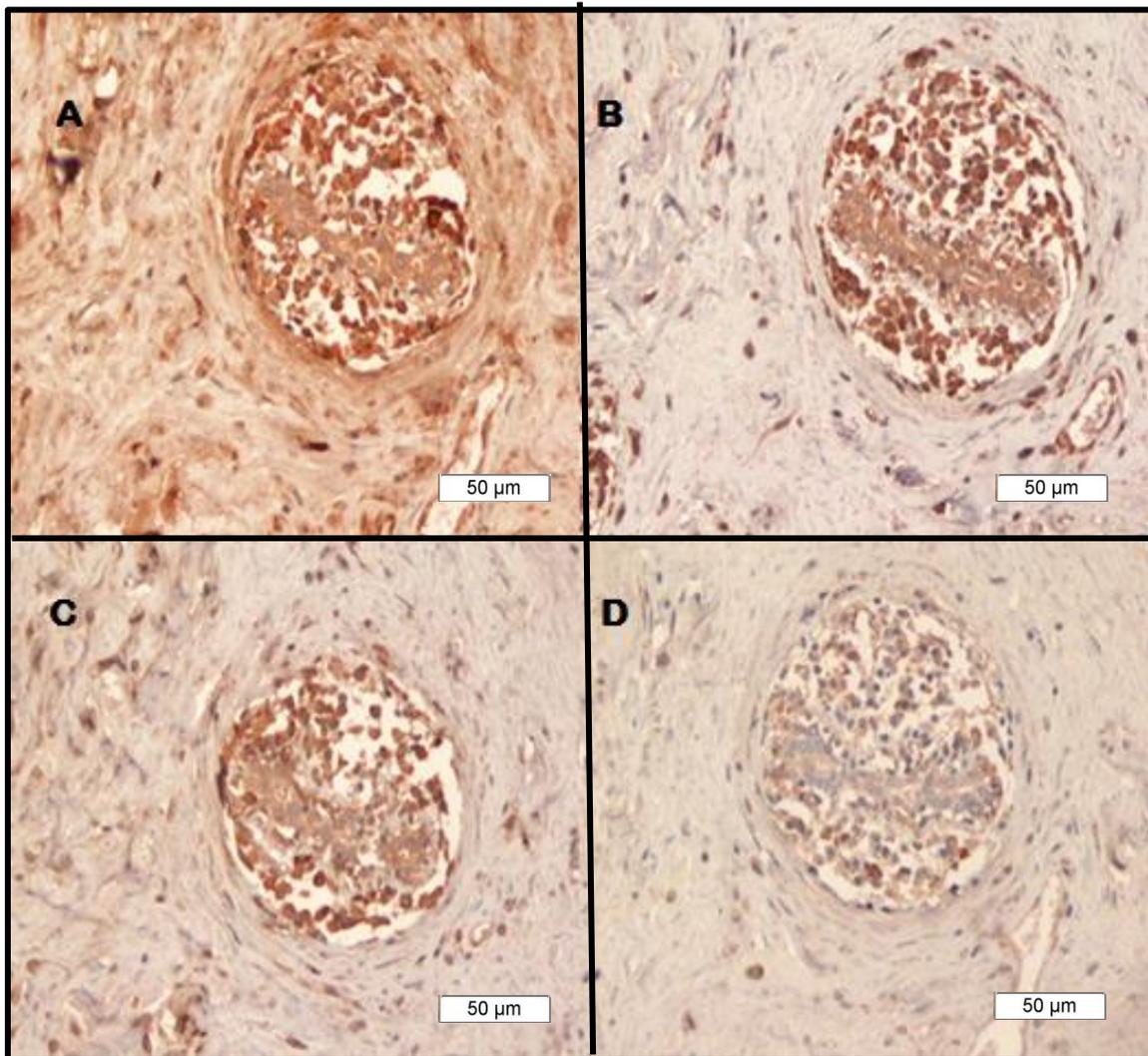
## **ANEXO 1**

### **ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE IHC PARA EL ANTICUERPO PRIMARIO: ADIPONECTINA 19F1 (Abcam ab22554)**

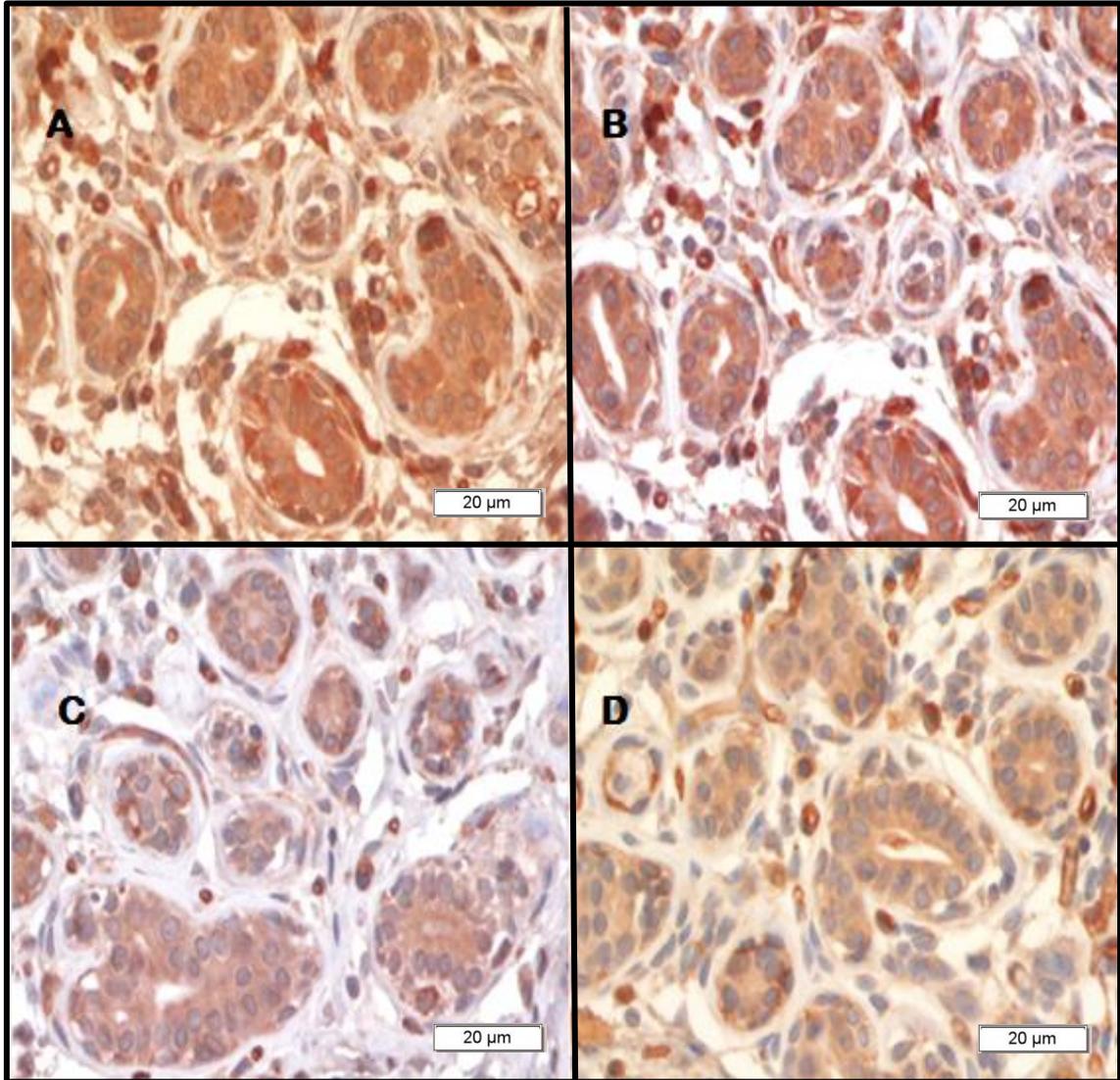
De las 100 mujeres reclutadas con CaM, se seleccionaron 3 pacientes con IMC normal y 1 paciente con tejido de mama normal (n=4). A partir de éstas se hicieron cortes del bloque de tejido tumoral mamario embebido en parafina a 2 micras, y se fijaron de una en una, en laminillas precargadas para su procesamiento.

Se probaron cuatro diferentes diluciones del anticuerpo primario, 1:150, 1:200, 1:300 y 1:500; para probar la dilución más óptima para el ensayo. La dilución del anticuerpo secundario anti-mouse IgG Biotin (eBioscience, 13-4015) utilizada fue de 1:100.

En la Figura 1 se muestra el tejido tumoral de las 3 pacientes con IMC normal tratadas con las cuatro diferentes diluciones. Del mismo modo en la Figura 2 se muestra el tejido de mama normal. Por lo tanto, en base a los resultados, la dilución más óptima para el ensayo fue 1:200, ya que la dilución 1:100 estaba muy concentrada y el marcaje para la IHC era muy alto, mientras que las diluciones 1:300 y 1:500 estaban muy diluidas y el marcaje para la IHC fue deficiente.



**Figura 1. Inmunohistoquímica Adiponectina 19F1. Tejido tumoral mamario (20X) con marca antigénica positiva a adiponectina tratadas a las diferentes diluciones: A) 1:150, B) 1:200, C) 1:300, D) 1:500. La dilución óptima para el ensayo 1:200.**



**Figura 2. Inmunohistoquímica: Adiponectina 19F1. Tejido mamario normal (40X) con marca antigénica positiva a adiponectina tratadas a las diferentes diluciones A) 1:150, B) 1:200, C) 1:300, D) 1:500. Se observa que la dilución más óptima para el ensayo fue 1:200.**

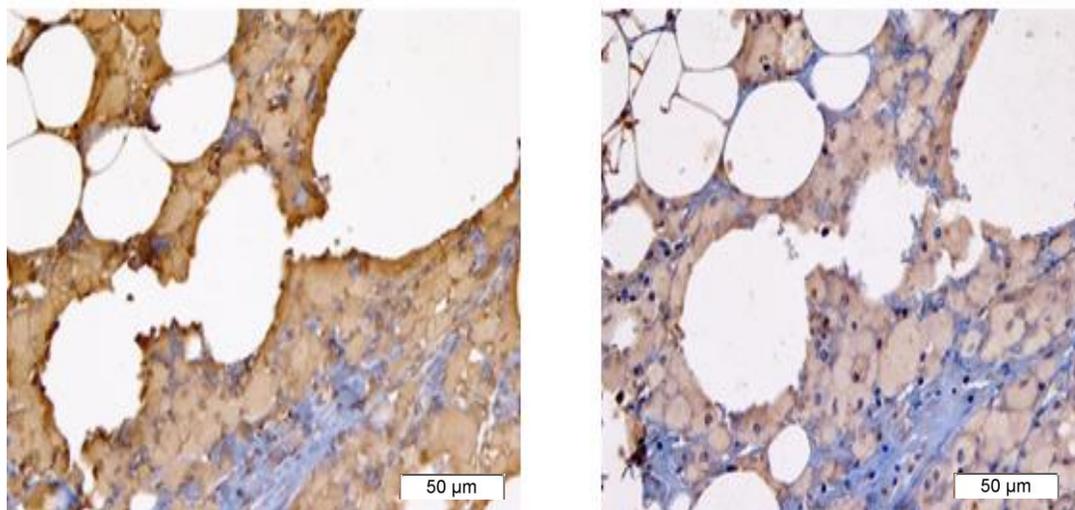
## ANEXO 2

### ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE IHC PARA EL ANTICUERPO PRIMARIO: ADIPOR2 (374-386) (Phoenix Pharmaceuticals; H-001-23)

Se seleccionaron 3 pacientes con un IMC normal para el anticuerpo primario (n=3). A partir de éstas se hicieron cortes en el bloque de tejido tumoral mamario embebido en parafina a 2 micras, y se fijaron en las laminillas precargadas correspondientes para su procesamiento.

Para determinar la dilución óptima para el ensayo se probaron dos diferentes diluciones del anticuerpo primario (de acuerdo a lo sugerido por el proveedor), 1:100 y 1:200. La dilución del anticuerpo secundario (anti-rabbit IgG Biotin; Jackson ImmunoResearch) utilizada fue de 1:100.

En base a los resultados obtenidos, la dilución 1:200 fue óptima para el ensayo, ya que la dilución 1:100 está muy concentrada, Figura 1.



**Figura 1. Inmunohistoquímica: AdipoR2. Tejido tumoral mamario (20X) con marca antigénica positiva a ADIPOR2 a las diferentes diluciones tratadas: A) Dilución 1:100; B) Dilución 1:200. Se observa que la dilución 1:200 fue la más óptima para el ensayo.**



## ANEXO A

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA



Título del protocolo: **“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA LEPTINA, DE LA ADIPONECTINA Y DE SUS RECEPTORES EN TEJIDO TUMORAL MAMARIO Y SU VALOR COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN MUJERES CON SOBREPESO U OBESIDAD QUE PRESENTAN CÁNCER DE MAMA NO HEREDITARIO”**

Investigador principal: Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Sede donde se realizará el estudio: Clínica de Obesidad; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

No 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 esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

El objetivo de este estudio es analizar la expresión de la leptina, su receptor, adiponectina y su receptor en tejido mamario tumoral de mujeres con peso normal, sobrepeso u obesidad y asociarlos a la agresividad del CaM.

#### **BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Con este estudio, mediante el trabajo con el tejido tumoral para detectar la presencia de esos marcadores, se podrá conocer por qué 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, ya que a mujeres jóvenes se les podría hacer el estudio de si la leptina, su receptor, la adiponectina y su receptor están presentes en el tejido tumoral, saber si pueden desarrollar un cáncer más agresivo y tomar medidas preventivas.

**RIESGOS Y MOLESTIAS**

- a) Por la toma de sangre: podría presentar malestar y/o dolor, formación de hematoma o morete en el sitio del piquete de la vena.
- b) Para la obtención de un bloque de parafina: ninguno.

**PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

Para este estudio se le tomará una muestra de sangre de 5 mililitros en una sola ocasión para ver sus concentraciones en sangre de la leptina y adiponectina y también se analizarán estos marcadores y sus receptores en el tejido mamario obtenido después de la cirugía (Bloque de parafina).

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, por lo tanto convengo en participar en este estudio de investigación por lo cual autorizó la toma de muestra de sangre, y la donación del 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 esta muestra además podría ser utilizada en otros estudios relacionados con cáncer con el fin de esclarecer los posibles mecanismos 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 con la investigación o con el tratamiento. La información obtenida en este 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 su participación.

Datos del investigador a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dr. Juan Alberto Tenorio Torres; teléfono de contacto: 5678 0600 ext.194 en turno vespertino, Instituto de Enfermedades de la Mama FUCAM: Calle Bordo N° 100, Col. Ejido de Santa Ursula Coapa.

**Firma y Fecha del participante**

**Investigador Responsable**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Testigo 1**

**Testigo 2**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO B

### TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA ESTABLECIDA

- 1) Desparafinar las laminillas en horno a 60°C (20 min)
- 2) Sumergir las laminillas en las soluciones siguientes (3 min) en el orden: Xilol 1, Xilol 2, Xilol-Alcohol (50-50%), Alcohol absoluto, Alcohol 96% y Agua destilada
- 3) Colocar laminillas en frasco Coplin con solución de citratos (Inmuno/DNA Retriever Bio SB). Hervir en olla por 12 min (recuperación antigénica). Se deja enfriar aprox. 40 min
- 4) Enjuagar con PBS-tween 20, después de delimitar el tejido con plumón (Biocare Medical)
- 5) Bloquear la peroxidasa endógena con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% [1mL] y metanol [9mL] (30 min). Se utilizan 200µL por cada muestra; hacer los cálculos pertinentes para el total de muestras
- 6) Lavar con PBS-tween 20 (3 veces)
- 7) Incubar con el anticuerpo primario y la dilución correspondiente (200µL por cada muestra a analizar). Se deja incubando a temperatura ambiente 24h
- 8) Después de las 24 h transcurridas, lavar con PBS-tween (3 veces)
- 9) Agregar e incubar el anticuerpo secundario (200µL c/muestra) a la dilución correspondiente (30-60 min)
- 10) Lavar con PBS-tween (3 veces)
- 11) Adicionar DAB (30 segundos)
- 12) Lavar con PBS-tween (3 veces)
- 13) Contrateñir con hematoxilina
- 14) Sumergir laminillas en las soluciones siguientes: Agua destilada, Alcohol 96%, Alcohol absoluto, Xilol-alcohol (50-50%), Xilol 1 y, Xilol 2
- 15) Secar laminilla por los bordes con gasas
- 16) Montar laminilla con Entellan (1 gota), con ayuda de un cubreobjetos.
- 17) Observar en microscopio