



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

Carrera de Biología

**“Determinación del transcriptoma de la línea celular MCF-7
en un microambiente de hiperglucemia/hiperinsulinemia”.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

Esteban Acosta Ramos

Directora de Tesis

Dra. Araceli Rubí Viedma Rodríguez

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias.

A mis padres

Por su amor, su sacrificio, su ejemplo de superación ante cualquier adversidad; por su guía en la obtención de cada logro y meta planteado; por su confianza para vencer cualquier reto, por sus valores y educación inculcados en mí. Este no es solo un triunfo personal, es una meta que cumplimos juntos. A ustedes les debo todos mis propósitos alcanzados, por lo que nunca podré pagar todos sus esfuerzos impuestos en mí.

A mis hermanos

Por su amistad, cariño y apoyo incomprensible, por los momentos y experiencias vividas a lo largo de mi vida. Por estar en todos esos momentos necesarios y por todos los logros que hemos alcanzados tanto individual como colectivamente. Gracias.

A mis amigos

Carla Ivette, Fernando Fong, Erika, Óscar Javier, José Jesús, Andrea, Óscar, Elizabeth, Jorge, Aritzel, a mis compañeros de laboratorio y a los que olvide mencionar. Por estar presentes en todos aquellos momentos importantes, los proyectos, las fiestas, reuniones y paseos, que hicieron de mi estancia en la Facultad inolvidable.

Agradecimientos.

A la Dra. Araceli Rubí Viedma Rodríguez por brindarme la oportunidad y confianza para la realización de este proyecto, por su paciencia, dedicación y conocimientos aportados durante su realización.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y a la Dra. Guadalupe Martínez Hernández por permitirme pertenecer a su grupo de investigación, proporcionarme los recursos para poder culminar un peldaño más en mi formación académica y profesional, por su apoyo y enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Ruth Ruiz Esparza y al Dr. Miguel Velázquez Flores por su asistencia en la realización del microarreglo y por la donación de diversos compuestos, sin los cuales este proyecto de tesis no podría haberse realizado.

A todo el comité asesor por su guía, consejos, observaciones y aportaciones que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo, que me permitieron concluirlo de manera satisfactoria.

A mi compañera Iris Jael Vázquez Navarrete, que sin su apoyo este proyecto no podría haberse culminado, además de los momentos y aprendizaje compartidos.

A mis amigos y compañeros por todos los proyectos y trabajos realizados a lo largo de la carrera que me permitieron crecer en mi formación académica.

A Estefanía Camacho Zamora por su apoyo, pláticas y momentos compartidos a lo largo de la carrera y por haberme impulsado a tomar este proyecto.

Índice.

| | |
|-----------------------------|----|
| Resumen | 1 |
| Marco teórico | 2 |
| Diabetes mellitus | 2 |
| Cáncer | 5 |
| Relación cáncer-diabetes | 18 |
| Modificaciones epigenéticas | 23 |
| Antecedentes | 25 |
| Justificación | 26 |
| Hipótesis | 27 |
| Objetivos | 28 |
| Metodología | 29 |
| Resultados | 33 |
| Discusión | 46 |
| Conclusiones | 49 |
| Perspectivas | 50 |
| Bibliografía | 51 |

Resumen.

Actualmente, la diabetes mellitus y el cáncer forman parte de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial, dado que en años recientes se ha reportado que mujeres con diabetes presentan una mayor predisposición al desarrollo de cáncer de mama. Estudios *in vitro* indican que la hiperglucemia e hiperinsulinemia son factores que pueden modificar los mecanismos de regulación génica favoreciendo al inicio y desarrollo del cáncer. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar los cambios en el transcriptoma de la línea celular MCF-7 inducidos por insulina en condiciones de alta concentración de glucosa.

Mediante un microarreglo de expresión GeneChip HTA 2.0, se analizaron los cambios en el transcriptoma en las células MCF-7 comparando 2 condiciones que simulan las que ocurren en el diabético: una de alta glucosa (HG) y otra de alta glucosa e insulina (HGI). Los datos del microarreglo fueron analizados por el software Transcriptome Analysis Console (TAC), destacando aquellos genes con una tasa de cambio de expresión ≥ 2 . En donde identificamos que la insulina induce cambios en la expresión de 1942 transcritos, de los cuales 1012 se encuentran expresados a la alta, y teniendo caracterizado el papel de 21 transcritos no codificantes y 20 codificantes, involucrados en la progresión del cáncer, además identificamos a 930 genes regulados a la baja, donde solo 37 transcritos codificantes y 7 no codificantes, se encuentran asociados con alguna función en el cáncer como en la proliferación, migración y resistencia a fármacos.

Posteriormente se determinó la concentración letal media (CL50) del tamoxifeno y se evaluó el efecto citotóxico de este fármaco en la población celular y la viabilidad celular en condiciones de alta glucosa con y sin insulina. Ambos ensayos demostraron que la insulina, ya sea en un microambiente de hiperglucémico o de glucosa normal, favorece el crecimiento de la población celular, y disminuye de manera significativa los efectos del tamoxifeno.

INTRODUCCIÓN

1. Diabetes mellitus

En años recientes la diabetes mellitus (DM) se ha posicionado como uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, ya que se estima que afecta a 422 millones de personas y sido la causa del deceso de 8.7 millones anualmente, además de que cada año se diagnostican alrededor de 17.5 millones de nuevos casos (OMS, 2016). México es el segundo país con mayor prevalencia de este padecimiento, al afectar a cerca de 6.4 millones de mexicanos, en donde las mujeres poseen la mayor tasa con 3.56 millones, en comparación con los hombres con 2.84 millones (ENSANUT, 2012, ENSANUT MC, 2016, Rojas-Martínez y col. 2018; Hernández-Ávila y col., 2013).

La DM es una agrupación de alteraciones metabólicas, que se caracteriza, en un inicio, por un aumento en los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia) ocasionado por una deficiencia en la biosíntesis de insulina, así como en su respuesta hormonal. Posteriormente se desencadenan alteraciones del metabolismo de ácidos grasos y proteínas, causando complicaciones como la cetoacidosis, el síndrome hiperosmolar no cetónico, infecciones, alteraciones crónicas e irreversibles en el tejido nervioso (neuropatías), y en el tejido vascular (micro y macroangiopatías) (American Diabetes Association, 2014; Meléndez y col., 2007). Aunado a esto diversos estudios epidemiológicos han señalado una asociación directa entre el padecimiento de DM con el aumento en la incidencia de diversos tipos de cáncer.

La etiopatogenia de la DM es multifactorial; debido a que se involucran cuestiones genéticas y ambientales, por lo que la Asociación Americana de Diabetes y la Organización Mundial de la Salud entre 1997 y 1998 establecieron una clasificación de esta enfermedad, considerando una fase prediabética y 4 grupos clínicos: diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2, diabetes mellitus gestacional y otros tipos específicos de diabetes (Fernández y col., 2015).

La fase prediabética se define por un aumento en la frecuencia urinaria (poliuria), en la ingesta de líquidos (polidipsia) y alimentos (polifagia), así como la pérdida de la fuerza muscular (astenia), fatiga y pérdida de peso, aunado a una

recurrencia en el padecimiento de infecciones gastrointestinales y urinarias que se relacionan con la descompensación en el metabolismo de glucosa (Guillén, 2002).

1.1 Diabetes mellitus de tipo I

La diabetes mellitus de tipo 1 (DMT1) representa el 5-10% de todo los casos de DM, es una enfermedad autoinmune que actúa en contra de las células beta pancreáticas generando un desorden metabólico, no obstante se han reportado casos en los cuales se desconoce su origen. Se presenta principalmente entre edades de 5 a 15 años, pero puede llegar a afectar a individuos de mayor edad, su diagnóstico toma en cuenta la presencia de hiperglucemia, polidipsia, polifagia y poliuria (Gregory y col., 2013 y Atkinson, y col., 2014).

El carácter autoinmune de la DMT1, se debe a la destrucción de las células beta pancreática por parte de los linfocitos B activados, estos no reconocen los marcadores de antígenos leucocitarios (HLA) expuestos. Esto es ocasionado por mutaciones puntuales en los genes DQ-A y DQ-B del complejo mayor de histocompatibilidad de Tipo II. Aunado esto se presenta la secreción de anticuerpos; como aquellos contra el islote beta (ICA), contra la insulina (IAA), contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), y contra tirosina fosfatasa alfa (IA-2 α) y beta (IA-2 β). Estos anticuerpos participan en el reconocimiento y eliminación de las islotes beta pancreáticos y de las enzimas encargadas de la secreción de la insulina, lo que conduce a hiperglucemia (Salas y col., 2013; Cervantes-Villagrana y Presno-Bernal,2013).

Por otro lado, se ha descrito otro un tipo de DMT1 de carácter no inmunológico, denominada DMT1 Idiopática. En donde el organismo presenta episodios de insulinopenia y cetoacidosis espontáneos, sin deberse a un aspecto de autoinmunidad, por lo que aún no se conocen las causas de esta enfermedad (Conget, 2002). En ambos casos el principal tratamiento es la administración exógena de análogos de insulina (AI) para la normalización de los niveles de glucosa, junto con agentes hipoglucemiantes, como coadyuvantes terapéuticos (Silverstein y col., 2005). Sin embargo, estas terapias provocan complicaciones como el aumento de peso, pérdida de la visibilidad, formación de edemas transitorios

y el desarrollo de ciertas neoplasias (Rodríguez, 2003). Esto último de acuerdo a estudios epidemiológicos, que indican que los análogos de la insulina ejercen un efecto carcinogénico, que depende de la dosis, la duración del tratamiento y el tipo de AI (Xukei y col., 2012; Suissa y col., 2011; Hemkens y col., 2009; Mayer, y col., 2008).

1.2 Diabetes mellitus de tipo II

La diabetes mellitus de tipo II (DMT2) es el tipo con mayor incidencia, al representar el 90-95% de todos los casos de diabetes. Es favorecida por la obesidad o sobrepeso en la población infantil/juvenil y adulta, asociados con el cambio a un estilo de vida sedentario, con una inadecuada alimentación y poca actividad física (Gil *et al.*, 2013).

Se le define como un padecimiento crónico-degenerativo, donde el organismo es incapaz de reducir los niveles de glucosa en el plasma, a causa de un déficit en los procesos de síntesis, liberación y acción periférica de la insulina. Durante el desarrollo de la diabetes se presentan episodios de aumento en la secreción de insulina para compensar los cuadros hipoglucémicos presentes en el organismo. Esto conlleva a la deficiencia y muerte de las células beta pancreáticas, estableciendo así los estados de hiperinsulinemia e hiperglucemia característicos del inicio de esta enfermedad (Mediavilla, 2002; Reyes y col., 2016, Salas y col., 2013 y Velasco y Brena, 2014). En personas con obesidad o sobrepeso la DMT2, se produce por un constante estrés inflamatorio por parte del tejido adiposo que ocasiona una disminución en la síntesis de insulina junto con un estado de resistencia a la misma. El estrés inflamatorio se produce por la secreción crónica y disponibilidad de citocinas inflamatorias, capaces de activar las vías de señalización de las cinasa amino terminal JUN (JNK), proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y el factor nuclear Kappa B (NF-κB). Las cuales interfieren con la cascada de señalización de la insulina afectando el metabolismo y desencadenado la hiperglucemia (Miranda-Garduño y Reza-Albarrán, 2007).

La hiperglucemia crónica favorece la activación de la proteína cinasa C, activación de la vía del sorbitol, la producción de radicales libres y del depósito de

productos de glicación avanzada. Todos ellos, agentes causantes del desarrollo de complicaciones vasculares que conducen a lesiones de la microvascularización de la retina, así como de la insuficiencia renal y enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis acelerada, cardiopatía coronaria y la formación de coágulos sanguíneos (trombosis) incrementando la predisposición de un infarto. Por otro lado, la hiperglucemia e hiperinsulinemia promueven la aparición y progresión del cáncer, mediante la inducción de proliferación y crecimiento celular, junto con la modificación del metabolismo de las células que permiten la alteración de sus comportamiento transformandolas a neoplásicas (Brownlee, 2001).

2. Cáncer.

El cáncer es una de las enfermedades con alta tasa de incidencia y prevalencia, además de ser la segunda causa de muerte a nivel mundial en la última década. Se caracteriza por la transformación de células normales a neoplásicas, debido a la adquisición secuencial de mutaciones genómicas que modifican su comportamiento, como es la desregularización de los procesos de proliferación celular, en los mecanismos de apoptosis y senescencia, además de la evasión de los mecanismos regulatorios de proliferación, lo que les permite replicarse de manera ilimitada. Así mismo ocurre un reprogramamiento metabólico e inducción de la generación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en los tejidos aledaños, para facilitar la llegada de nutrientes. Finalmente se presenta una evasión del sistema inmune junto con la activación de la capacidad invasiva y metastásica llevando a la muerte del organismo (Hanahan y Weinberg, 2011; Hanahan y Wienberg, 2000; Hecker, 1976). El incremento de las células neoplásicas favorece la presencia de una serie de alteraciones en el tejido, ya que el conjunto de células modificadas inducen cambios en las células adyacentes, generando un microambiente necesarios para la progresión y sobrevivencia del tumor (Kings & Robins, 2006).

La clasificación del cáncer se basa de acuerdo al tejido u órgano en donde se desarrolla el tumor. Al ser una enfermedad con una gran diversidad de tipos tumorales, de acuerdo a la célula de origen se clasifican en carcinomas, leucemias o linfomas, melanomas, neuronales, sarcomas y germinales (tabla 1) (Alegría-Loyola

y col., 2017; Mercadillo y Moreno, 2013; Rodríguez y Godoy, 2008; Casariego y Baudo, 2004).

Tabla 1. Clasificación de los tumores acorde a los tejidos que las originan.

| TIPO DE TUMOR | CARACTERISTICAS |
|---------------------------|---|
| CARCINOMAS | Proceden de los epitelios que tapizan la superficie corporal (epidermis de la piel) y las cavidades y órganos . |
| LEUCEMIAS O | Proceden de los tejidos formadores de células sanguíneas (médula ósea o bazo), se caracterizan por la sobreproducción de células blancas inmaduras. |
| LINFOMAS | |
| MELANOMAS | Derivados de los melanocitos y las células névicas que se presentan en cualquier región corporal. |
| NEURONALES | Proceden del sistema nervioso central. |
| SARCOMAS | Procedentes del tejido conectivos (huesos, cartílago) |
| GERMINALES | Derivados de las células germinales primordiales. |

Nota: ¿hay tumores de músculo esquelético?

Los carcinomas son el tipo de tumor más común actualmente debido a que su desarrollo se debe a un gran número de factores de riesgo como la interacción con carcinógenos (agentes biológicos, físicos o químicos capaces de inducir cambios en el genoma celular), la alimentación, actividad física, el consumo de alcohol, tabaco y otras sustancias que alteran los niveles metabólicos y hormonales que favorecen la evolución a células neoplásicas. Los carcinomas se dividen en dos formas; los carcinomas escamosos, que se caracterizan por tener un fenotipo similar a las células epiteliales y no presentar un alto grado de agresividad y los adenocarcinomas, los cuales se derivan de células glandulares y presentan un alto grado de agresividad y un incremento en el número de receptores hormonales (Idikio, 2011).

2.1 Cáncer de mama.

El cáncer de mama es el adenocarcinoma con mayor impacto en la población femenina, se estima que cada año se diagnostican alrededor de 1.7 millones de nuevos casos y es una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial. Anteriormente se le consideraba como una enfermedad ocasionada por la

menopausia debido a que se presentaba principalmente en mujeres entre los 40-50 años; hoy en día la edad de su diagnóstico es cada vez menor a causa de la interacción de diversos factores de riesgo (McPherson, Steel y Dixon, 2000; Hulka y Moorman, 2001). Entre los cuales se encuentran la edad y peso de cada individuo, su historial clínico y familiar, la edad de su primera menstruación (menarca), primer embarazo, estilo de vida, alimentación, y el consumo de tabaco, alcohol y otras sustancias (Briton y Devesa, 1996).

El cáncer de mama se define como la transformación neoplásica de las células glandulares (carcinoma tubular) o conductuales (carcinoma ductal) que conforman el tejido mamario. Sin embargo se han identificado otros tipos, menos comunes, como los filoides y los angiosarcomas, los cuales se han establecido como tumores benignos (Biplob y col., 2018). Esta es una enfermedad heterogénea por lo que se ha optado por una clasificación concisa para su diagnóstico y tratamiento basada en aspectos histológicos y marcadores moleculares (Connolly y col., 2004; Stingl y Caldas, 2007).

La identificación de cada subtipo de cáncer de mama considera cuestiones histológicas del tumor como su origen, el aspecto de las células, el tamaño, acomodo y crecimiento de éstas, además de si se encuentra o no en proceso de diseminación, y de su propagación en vasos linfáticos o en el sistema vascular. Lo cual ha permitido la determinación de dos grandes grupos histológicos los carcinoma *in situ* (CSI) y los carcinomas invasivos o infiltrantes (IC) (Malhotra, y col., 2010). Los CSI son el tipo más común y se presentan de dos formas. El primero es el carcinoma lobular (LCSI), el cual se desarrolla en las células glandulares productoras de leche; el segundo es el carcinoma ductal (DCSI) que se da en los ductos transportadores de leche para su liberación por el pezón. Los DCSI es el grupo más amplio por lo que se le ha subdividido en 5 tipos; comedo, cribiforme, micropapilar, papilar y sólido, de acuerdo a su crecimiento y forma celular (figura 1) (Pathak y col., 2016).

Los IC representan las etapas histológicas más avanzadas del cáncer y con la mayor diversidad de subtipos tumorales, entre los principales carcinomas identificados se encuentran los ductales infiltrantes (IDC), infiltrantes tubulares,

ductales/lobulares, invasivos lobulares, mucinosos o coloides y medulares. Los IDC son el subtipo más estudiado y constituyen el 70-80% de todas las lesiones invasivas, por lo que de acuerdo al grado de diferenciación del tumor que va en función de los niveles del pleomorfismo nuclear, su origen glandular o tubular y del índice de división mitótica, se le subclasifica en: grado 1 (poco diferenciado), grado 2 (moderadamente diferenciado), y grado 3 (altamente diferenciado) (Lester y col., 2009).

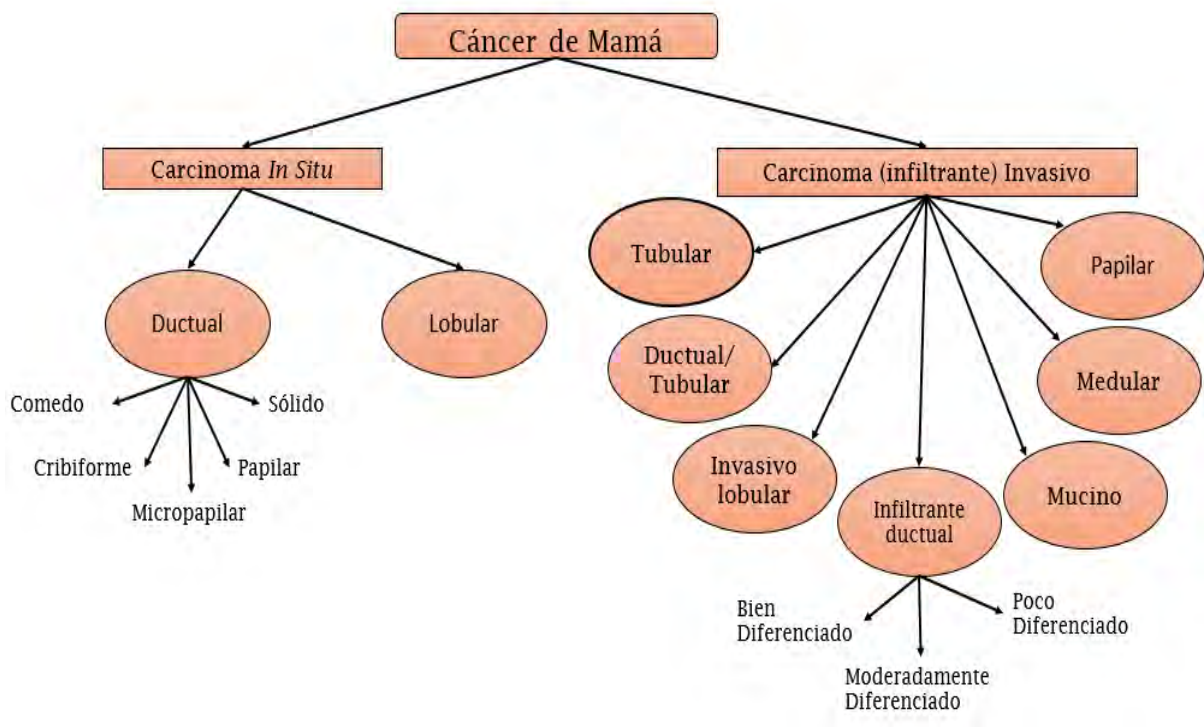


Figura 1. Clasificación de los subtipos histológicos del cáncer de mama, se basa en la identificación clínica de la heterogeneidad que presentan en la forma de crecimiento y aspecto celular de cada uno. Modificado de Malhotra y col., 2010.

Recientemente se ha establecido una clasificación adicional para el diagnóstico y determinación del tratamiento para los subtipos intrínsecos del cáncer de mama de acuerdo a la expresión genética de ciertos receptores. Lo que ha permitido identificar 6 subtipos; luminal A, luminal B, de tipo basal, rico en Her2, bajos en claudinas y tipo normal (figura 2) (Perou y col., 2000).

- El luminal A es el subtipo con mayor persistencia y se define por presentar una alta expresión de los receptores a estrógeno (ER) y progesterona (PR), pero una baja expresión del receptor para el factor de crecimiento epidermal humano (HER2/ERBB2), junto con una baja expresión de los receptores asociados a los procesos de proliferación, como los del factor Ki67. Además se le ha asociado a un pronóstico clínico favorable para supervivencia del paciente y en la respuesta a la terapia hormonal.
- El luminal B es un subtipo de carcinoma que exhibe baja expresión de los receptores ER y PR, y con una sobreexpresión de los receptores HER2/ERBB2, así como en los genes asociados a los procesos proliferativos. Por lo que su pronóstico es poco favorable en la supervivencia del paciente, además de requerir terapias no hormonales.
- El subtipo basal corresponde a las segundas neoplasias más frecuentes y se caracterizan por no presentar ningún tipo de receptor hormonal, por lo que se les ha denominado clínicamente como tumores triple negativos. Pero si exhiben una sobreexpresión de citoqueratinas basales (CK5/6/14/17) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). De igual forma presentan mutaciones en las regiones cromosómicas codificantes para los genes BRCA1, TP53 y Rb1, encargados de la supresión del proceso proliferativo, la regulación del daño al genoma y la inducción del proceso de apoptosis. Además son las neoplasias más agresivas y con peor pronóstico clínico
- El subtipo rico en HER2/ERBB2 se caracteriza por presentar altos niveles de estos receptores HER2/ERBB2 y de GRB7, todos ellos encargados de la inducción de los procesos proliferativos y de crecimiento celular. Son un subtipo que presenta una variabilidad en su pronóstico clínico.
- Los tumores bajos en claudinas y de tipo normal, aún se encuentran en controversia, debido a su nula similitud con las lesiones anteriores y por exhibir una gran semejanza genética con las células basales y adiposas del tejido mamario.

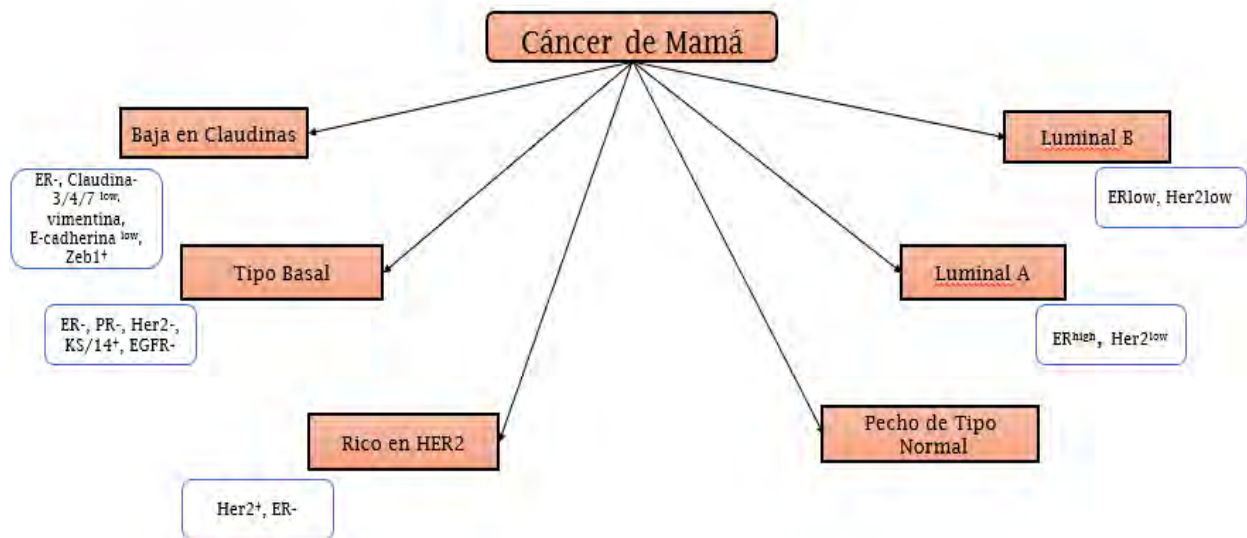


Figura 2. Clasificación de los subtipos moleculares del cáncer de mama, se basa en los niveles de expresión de ciertos RNA's mensajeros para la síntesis de cada receptor. Modificado de Malhotra y col., 2010.

2.2 Mecanismo de acción de los estrógenos.

Los estrógenos facilitan el desarrollo y progresión del cáncer de mama; debido a que activan diversos genes involucrados en la carcinogénesis. Se estima que alrededor del 70% de los casos son positivos al receptor de estrógenos (ER).

Los ER pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que sirve como factores de transcripción. Estos se expresan en dos isoformas; ER α y ER β , ambas son codificadas por genes distintos, localizados en los cromosomas 6 y 14, respectivamente, y presentan una homología en su estructura molecular; ya que ambos están compuestos por seis dominios, los cuales son denominados con las letras de la A a la F (figura 3) y se describen a continuación (Curtis y Korach, 2002, García-Becerra y col., 2013).

- Dominio A/B o N-terminal: Contiene la región de activación de la transcripción genética 1 (AF1), junto con varios sitios de fosforilación que son responsables de la actividad transcripcional en ausencia de su ligando.
- Dominio C o de unión al DNA: Región compuesta por nueve residuos de cisteína, donde ocho residuos se encuentran interaccionando con

dos iones de Zn^{+2} , los cuales forman dos estructuras de dedos de zinc, que permiten la dimerización entre dos receptores activados y su posterior unión con la secuencia específica de transcripción del DNA, es mediada por los aminoácidos presentes en estas estructuras y son conocidas como cajas P (P-box).

- Dominio D o bisagra: Ubicada entre los dominios C y E, que se caracteriza por ser la zona de unión a la proteína chaperona de choque térmico 90 (hsp90) y por contener la señal de localización nuclear, necesarios para la translocación del receptor al interior del núcleo.
- Dominio E o de unión al ligando: Región que contiene la segunda señal para su localización nuclear, la función de la activación de la transcripción genética 2 (AF2). Es responsable de la activación del receptor al interactuar con su ligando, además de la zona de unión al ligando, que consta de una región de doce hélices alfa y del sitio de dimerización con otro receptor.
- Dominio F o C-terminal: Región de menor tamaño, encargada de la modulación de AF1 y AF2, sin embargo no es necesaria para la activación transcripcional.

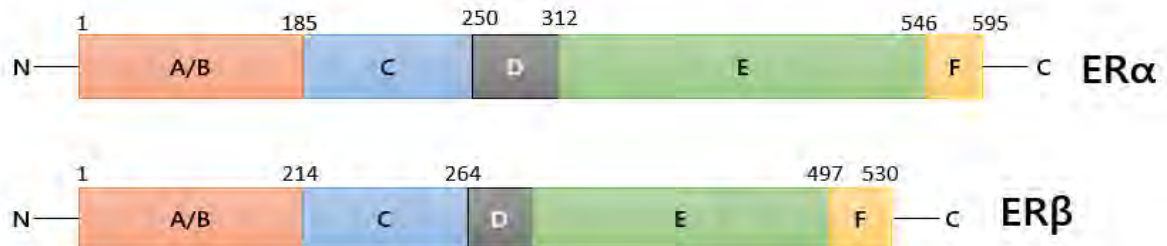


Figura 3. Comparación entre los receptores de estrógenos. Ambos receptores presentan una homología cercana al 97%, variando en la composición de aminoácidos que los componen. El dominio A/B en el amino terminal (N) contiene el sitio AF1. El dominio C presenta el dominio de unión al DNA (DBD por sus siglas en inglés) y el sitio de dimerización. El dominio D contiene la señal de localización nuclear. El dominio E presenta el sitio de unión al ligando, así como del dominio AF2, la segunda señal de localización nuclear y otro sitio de dimerización. Modificado de García-Becerra y col., 2013

Los ER α y ER β se encuentran en el tejido mamario, pero en distintas concentraciones, siendo el ER α el más abundante, y se encuentra altamente relacionado con el inicio y avance del cáncer de mama, ya que se encuentra involucrado en la activación de los procesos de proliferación y supervivencia celular a través de interacción directa con el genoma o a través de la activación de distintas vías de señalización (Farooq, 2015).

La vía canónica es la ruta por la cual el receptor induce la transcripción de diversos genes, iniciando con la unión de su ligando, el 17 β -estradiol, en el citosol, formando el complejo ligando-receptor (E2-ER α), el cual sufre cambios conformacionales que le permite su disociación con sus proteínas de unión, la dimerización con otro receptor activado y su translocación al interior del núcleo, a través de los poros nucleares (Fuentes y Silveyra, 2019; Osborne col., 2001). En el núcleo, el complejo E2-ER α interacciona con el DNA por 2 formas; la primera es mediante la unión a la región de elementos de respuesta a estrógenos (ERE), a través de la unión de proteínas co-activadoras, como la proteína activadora 1 (AP-1), la coenzima A o la proteína del factor de transcripción Sp1, para su fosforilación. La segunda forma es por medio de la activación del receptor independientemente de su ligando, y es de las vías de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1), lo cuales permiten la fosforilación del receptor y su dimerización, ocasionando su movilización al núcleo iniciando la transcripción celular (fig. 4) (Hosford y Miller, 2014; Ignar y col., 1992; Stoica y col., 2000).

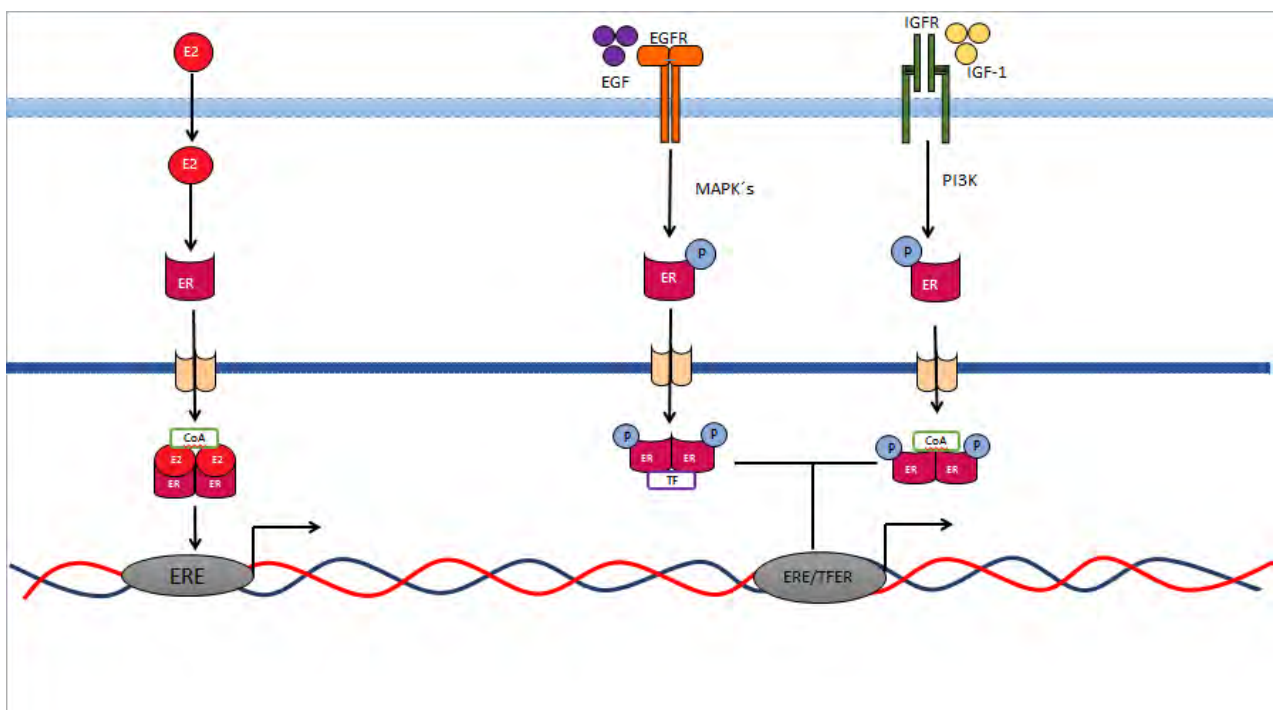


Figura 4. Activación transcripcional por ER α . La unión del estrógeno (E2) con su receptor permite su translocación al interior del núcleo por el poro DLC1, en el núcleo este complejo interacciona con la coenzima A (CoA) o con la proteína AP-1 que facilita la unión con el DNA y su transcripción. Existen otras formas de activación del ER α las cuales son mediante el receptor del factor similar a la insulina (IGFR) por la vía del PI3K o por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por medio de la vía MAPK, lo que ocasiona la fosforilación del receptor permitiéndole interactuar con la CoA y AP-1 para su unión al DNA. Modificado de Hosford y Miller, 2014.

2.3 Tratamiento del cáncer de mama

La gran heterogeneidad de esta enfermedad ha llevado al establecimiento de diversos tratamientos que se dividen en dos grupos; los locales y los sistémicos. Los primeros se basan en la eliminación por métodos quirúrgicos o de radiación sin dañar el tejido circundante. Mientras que los tratamientos sistémicos se basan en la administración de fármacos para la eliminación de las células cancerígenas, su administración es por vía oral o a través del torrente sanguíneo, entre los cuales se encuentran las quimioterapias, inmunoterapias, terapias dirigidas y terapias hormonales (American Cancer Society; Faksheena, Razvi & M. Ali, 2017).

EL aumento de los niveles de los estrógenos y progesteronas son dos de los principales factores involucrados en el desarrollo y progreso del cáncer de mama, por lo que su principal tratamiento se basa en la inactivación de los mecanismos de acción de estas hormonas, mediante la incorporación de moléculas que compiten por la unión de sus receptores, inhibiendo así las vías de señalización inductoras del crecimiento tumoral mediante los procesos de proliferación, crecimiento y migración celular (Maffuz-Aziz y col., 2015; Pérez-Rodríguez 2017; Osborne, 2014).

Existen diversos tipos de terapias hormonales contra el cáncer de mama como el bloqueo de la función ovárica, inhibidores de la producción de estrógenos y el bloqueo de los efectos del estrógeno (Caicedo y col., 2007; Chia y col., 2010; Hinojosa, y col., 2010; Abraham & Staffurth, 2015).

1. Bloqueo de la función ovárica: Es un tipo de terapia hormonal, denominada *ablación ovárica*, la cual se realiza a través de un proceso quirúrgico, en donde se extraen los ovarios, o por medio del consumo

de fármacos, denominados agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que promueven la liberación de GnRH, disminuyendo la síntesis y liberación de las hormonas encargadas de promover la producción de estrógenos.

2. Inhibidores de la producción de estrógeno: Son fármacos utilizados para la inhibición de la actividad de la aromatasas, la cual se ubica principalmente en los ovarios y es la responsable de la producción de estrógenos. Se conocen dos tipos de mecanismos de acción de los inhibidores de aromatasas. El primero se establece por la competición por la unión al sitio catalítico de la enzima con su sustrato natural, lo que ocasiona la formación de enlaces covalentes que permiten la inactivación irreversible de la enzima. El segundo se basa, de igual forma, en la competición por el sitio de unión al sustrato, pero esta unión es momentánea y la inhibición de la actividad enzimática depende de la concentración de los inhibidores. Este tratamiento se emplea principalmente en mujeres posmenopáusicas.
3. Bloqueo de los efectos de estrógenos: Consiste en la interferencia en la unión de los estrógenos con sus receptores lo que se realiza principalmente por los fármacos denominados moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), estos se comportan tanto como competidores de los sitios de unión (antagonistas) a estrógenos en ciertos tejidos o como impulsores de los efectos (agonistas) de los estrógenos en diversos tejidos. Este es el principal tratamiento contra el cáncer de mama positivo a receptores hormonales.

2.3 Tamoxifeno

El tamoxifeno es el principal prototipo de los SERM. Es un medicamento reconocido desde 1977 por la Administración de Drogas y Alimentos en Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento del cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas, sin embargo actualmente su prescripción es como tratamiento coadyuvante para todos los subtipos de cáncer de mama positivos a receptores de estrógenos (Terán & Teppa, 2005).

El tamoxifeno es un profármaco no esteroide derivado del trifeniletileno, el cual actúa como un agente agonista, en el útero, pero actúa como un antagonista estrogénico en el tejido mamario. Su mecanismo de acción se basa en la competencia con los estrógenos por sus receptores, presentando los estrógenos una afinidad de 100 a 1000 veces mayor por sus receptores que el tamoxifeno (Sonsoles *et al*, 2010).

Se le denomina como profármaco debido a que su acción depende de su metabolismo a N-desmetiltamoxifeno (endoxifen), *trans*-4-hidroxitamoxifeno (afimoxifen) y 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno. El metabolismo del tamoxifeno ocurre en el hígado por las isoformas del citocromo P450-CYP26 y CYP3A4 (figura 5). El *trans*-4-hidroxitamoxifeno presenta el mayor efecto antiestrogénico debido a que sus grupos hidroxilos facilitan la interacción con el ER α de las células del tejido mamario (Higgins *et al*. 2009; Rozembaum, 2008). El *trans*-4-hidroxitamoxifeno forma un complejo con el ER α , el que permite el reclutamiento de diversas proteínas co-represoras como el receptor nuclear NcoR/SMTR y la proteína PAX2 facilitando así su unión al DNA e inhibiendo la expresión de genes involucrados en la carcinogénesis (figura 6) (Ali *et al*. 2016).

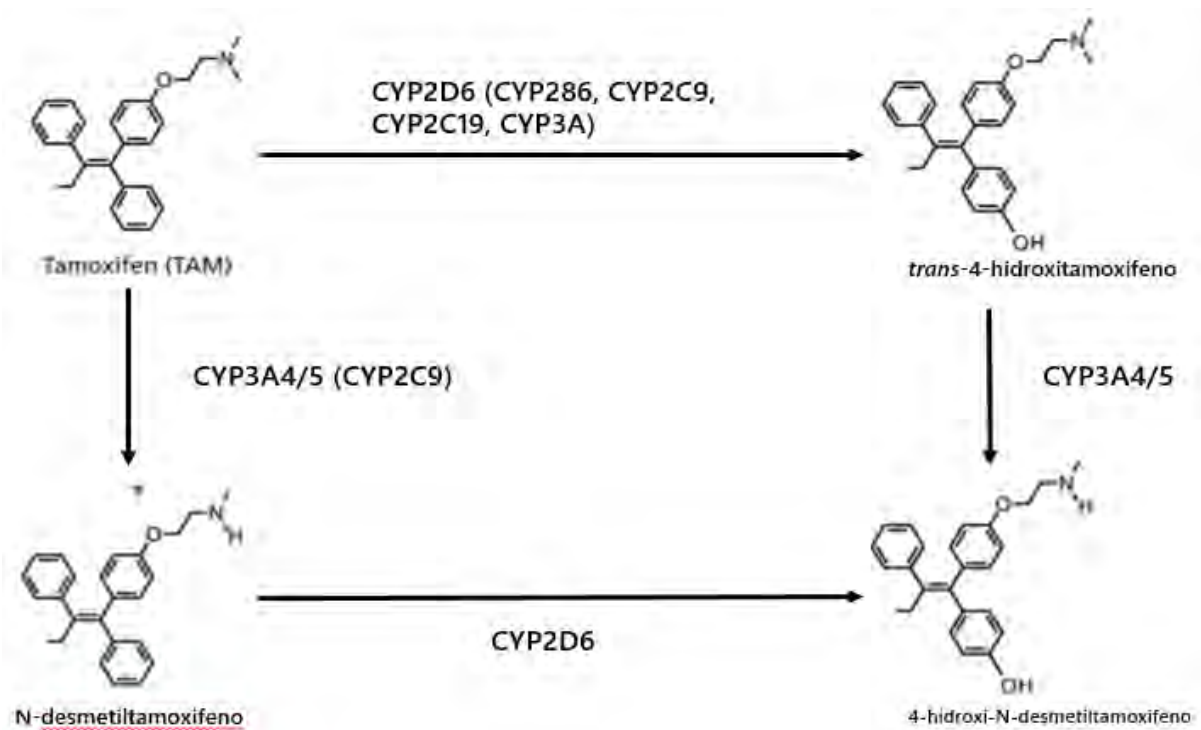


Figura 5. Metabolismo del tamoxifeno. El Citocromo P450 (CYP) 3A4/5 es responsable de la formación de N-desmetil-tamoxifeno. La transformación de tamoxifeno a *trans*-4-hidrotamoxifeno y N-desmetiltamoxifeno a 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno es a través del CYP2D6. Otras isoformas de CYP como CYP286, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A y CYP2C9 han sido caracterizadas *in vitro*. Modificado de Higgins *et al.* 2009.

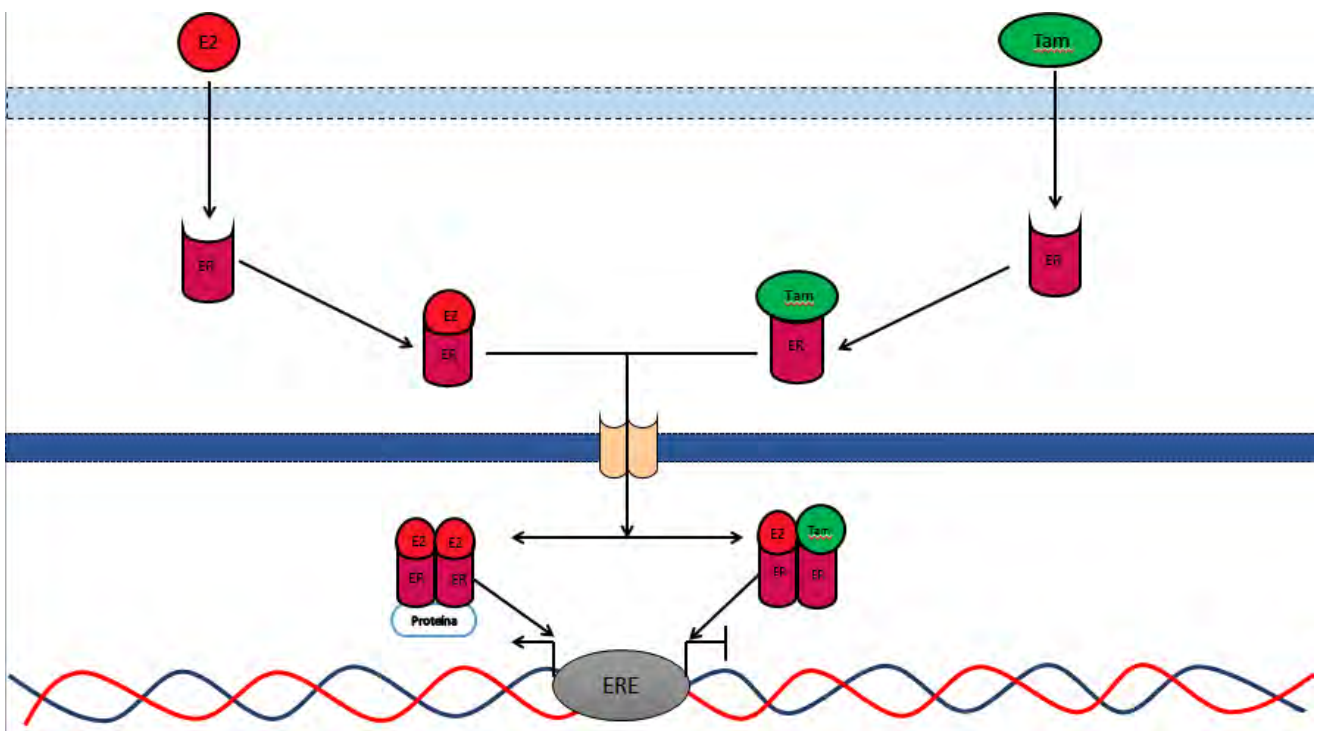


Figura 6. Mecanismo de acción del tamoxifeno (Tam). La unión del estrógeno (E2) con su receptor (ER) permite la activación y translocación del complejo E-R al núcleo en donde interacciona con distintas proteínas que permiten la transcripción de los genes involucrados en el crecimiento y supervivencia del tumor. El tamoxifeno compite con el E2 por la unión con el receptor ER, inhibiendo así la expresión de genes carcinogénicos.

Algunos pacientes presentan resistencia al tamoxifeno, ocasionada por factores intrínsecos del tumor, como son la expresión de RNAs no codificantes, la proporción y funcionalidad del ER α , así como cambios en la expresión de diversos genes involucrados en la proliferación, crecimiento e invasividad del tumor, por lo que en distintas ocasiones se requiere un tratamiento complementario, que afecte a estos mecanismos y contribuyan a la erradicación del tumor. (García-Becerra y col., 2013; Hosford y Miller, 2014).

3. Relación diabetes y cáncer.

La DM favorece al desarrollo de cáncer de mama, de acuerdo con un meta-análisis los pacientes con DM tienen 20% más probabilidad de desarrollar neoplasias de mama que los individuos euglucémicos, junto con mayor mortalidad por esta enfermedad (Larsson y col., 2007).

Sin embargo, no se sabe las relaciones que existen entre ambas patologías, lo que ha llevado al estudio de todos los factores biológicos involucrados en la DM; como obesidad, persistencia de un estado inflamatorio, incremento en la concentración de colesterol en el plasma (dislipidemia), hiperglucemia, hiperinsulinemia, alteraciones de los niveles hormonales y de adipocinas. Esto con el fin de poder determinar el papel de cada uno en el desarrollo y progresión del cáncer de mama (Gallagher y LeRoith, 2009; Duarte y col., 2016; Gristina y col., 2014). Se ha destacado que las condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia son los principales factores de riesgo en el desarrollo de tumores.

3.1 Hiperinsulinemia.

La hiperinsulinemia es un estado fisiopatológico inicial de la DM, que se caracteriza por un aumento en la producción y secreción de insulina, así como un

estado de resistencia a sus efectos, lo que desencadena un sinnúmero de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Donde su actividad biológica depende de su interacción con su receptor (IR). El IR pertenecen a la superfamilia de tirosincinasas, que se caracterizan por sufrir cambios conformacionales que permiten la fosforilación de residuos de tirosina (Tir) (Vigneri y col., 2016; Mendivil y Sierra, 2005; Boucher y col., 2014).

La interacción de la insulina con alguno de sus receptores, IR α o IR β , promueve la activación de dos vías de señalización. El IR β se expresa en células musculares, adiposas y hepáticas, y es necesario para la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos. La interacción de la insulina con este receptor desencadena la activación de la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/proteína cinasa B (Akt) y de la vía de las proteínas adaptadoras APS y CAP, que permiten la translocación del transportador GLUT-4 a la membrana plasmática incrementando la captación de glucosa (figura 7) (Gutiérrez-Rodelo, y col., 2017; Vigneri y col., 2016; Olivares y Arellano, 2008).

El IR α se expresa en la placenta, tejidos embrionarios y fetales, además de células tumorales, puesto que es necesario para la estimulación de genes involucrados en proliferación y supervivencia, mediante la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's). Esta ruta es estimulada tras el acoplamiento de la insulina con el IR α , provocando cambios conformacionales dentro del receptor que autofosforila su porción intracelular, lo que permite la asociación del sustrato del receptor de insulina y de la proteína adaptadora SHC1, uniéndose el complejo proteico Grb2/SOS, en donde SOS favorece el intercambio de nucleótidos a guanina capaz de activar a la proteína Ras. Esta última enciende a la molécula Raf-1 y desencadena la cascada de las MAPK, que tienen como blanco factores transcripcionales, como la proteína de tipo Elk-1, encargada de la expresión de genes involucrados en proliferación, crecimiento, migración e invasividad tumoral (figura 7) (Vella y col., 2018; Vigneri, Goldfine y Frittitta, 2016; Belfiore y Malaguarnera, 2011; Bastarrachea y col. 2005).

En los carcinomas ductuales *in situ*, positivos a receptores de estrógenos se ha observado una sobreexpresión del IR α ; sin embargo no se conoce la causa de su

predominancia en éstos tumores, pero se le ha atribuido a la presencia de la proteína HMGA-1, un factor transcripcional que regula a la baja la expresión e inactivación del gen p53, lo cual permite la exposición del promotor de IR e IGFR promoviendo su transcripción (Aiello y col., 2010; Chiefariet y col., 2013; Fusco y Fedele, 2007)

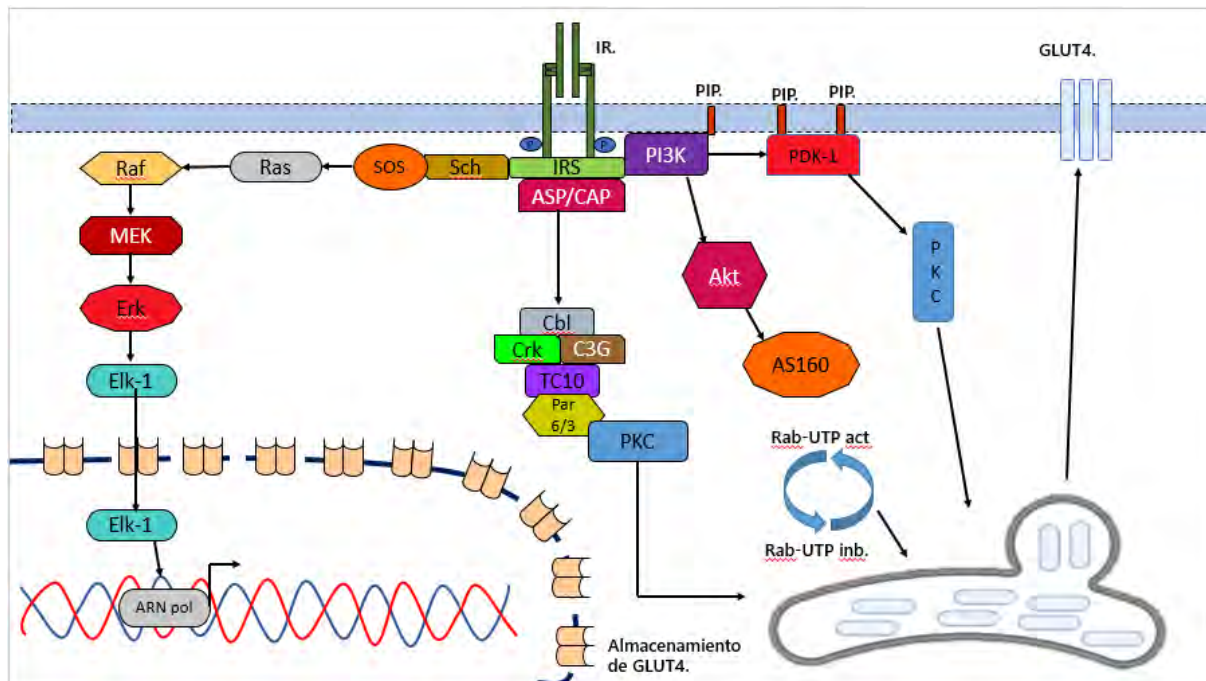


Figura 6. Vías de señalización activadas por insulina. La unión del ligando al IR β estimula la vía de la PI3K/Akt, PI3K/PKC y por el complejo ASP/CAP, para la translocación del GLUT4 a la membrana. La unión de la insulina con el IR α estimula la activación de la vía MAPK's y esta lleva a la transcripción de proteínas involucradas en proliferación, ciclo celular, invasividad y metastasis tumoral. Modifica de Belfiore y Malaguarnera, 2011.

Las altas concentraciones de insulina permiten su interacción con el receptor del factor similar a la insulina (IGFR), estimulando las vías de señalización de PI3K/Akt/la molécula diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), lo que promueve la transcripción de genes involucrados en la carcinogénesis, junto con la inhibición de la señalización del oncogén de β -catenina y de las MAPK que estimulan a los factores de transcripcionales Snail y Slug, responsables de la inducción de genes involucrados en la proliferación, ciclo celular y migración, así

como en la síntesis de proteínas antiapoptóticas (Mercadillo y Moreno, 2015; Giovannucci y col., 2010; Xu y col., 2014; Pollak y col., 2004).

Por otro lado, la constante secreción de insulina por el páncreas disminuye la síntesis de la proteína de unión a IGF-1 (IGFBP-1), lo que incrementa la biodisponibilidad de este factor en plasma (Frystyk y col., 1999). Las altas concentraciones de IGF permiten la activación de sus receptores, desencadenando las vías de señalización previamente descritas involucradas en el inicio, desarrollo y crecimiento de los tumores mamarios (Wolf y col., 2005). Estudios de caracterización de los receptores presentes en los carcinomas mamarios han destacado la presencia de híbridos de IR y IGFR, ya que presentan un 50% de homología entre sí, incrementando así el proceso de carcinogénesis (Sun y Kashyap, 2011).

Adicionalmente a estas alteraciones, se presenta una disminución en la producción y liberación de las globulinas de unión a las hormonas sexuales (SHBG), aumentando los niveles libres y bioactivos de estrógenos, con la activación de las vías de señalización involucradas en procesos de división celular, anti-apoptóticos, mutagénicos y metástasis. Aunado a lo anterior, hay una interconexión entre las cascadas de señalización de IGFR y ER α , que son causantes de la resistencia a terapias hormonales usadas para el tratamiento de cáncer de seno (Osborne y Schiff, 2011; Osborne y col., 2005; Giuliano, Trivedi y Schiff, 2013).

3.2 Hiperglucemia.

La hiperglucemia es otro factor causante del desarrollo de neoplasias en el tejido mamario; ya que promueve la tumorigénesis, proliferación celular, metástasis e inhibición de la apoptosis. El desencadenamiento de la transformación de las células tumorales por las altas concentraciones de glucosa es a través de efectos indirectos; el incremento en los niveles de la insulina y del IGF permite el aumento de la síntesis de las citocinas inflamatorias, como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la generación de especies reactivas de oxígenos (ROS), la glicación de moléculas y modificaciones epigénéticas (figura 7) (Mathews y col., 2018).

La persistencia de las altas concentraciones de glucosa conlleva a la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF α en las células adiposas, es por la expresión de oncogenes reguladores del ciclo celular, proliferación tumoral, inhibición de la apoptosis e inducción de la transición epitelio mesénquima (TEM) en las células tumorales (Pothiwala y col., 2009).

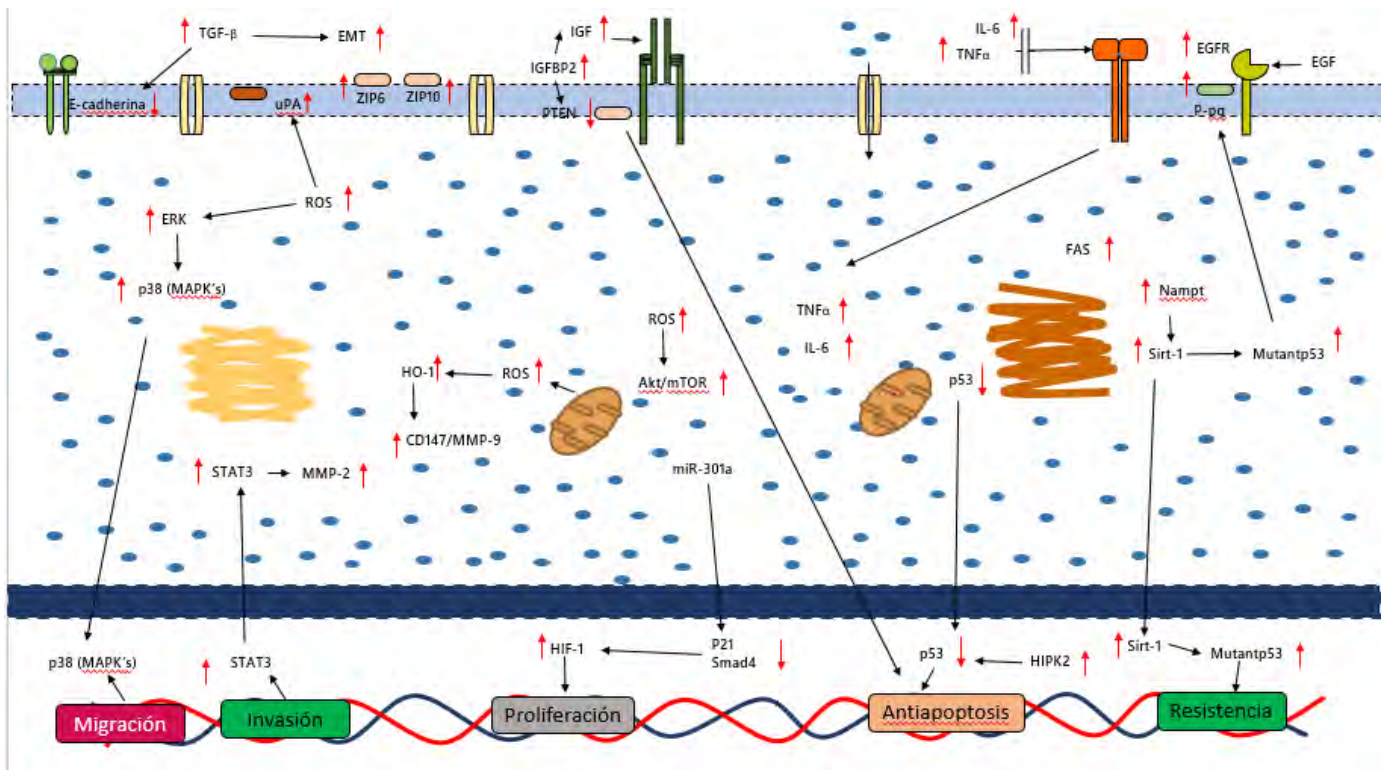


Figura 7. Mecanismos de carcinogénesis activados por las altas concentraciones de glucosa. Las flechas rojas indican el incremento de la activación o inactivación de cada molécula. Los mecanismos de migración, invasión, proliferación, resistencia y anti-apoptóticos son mediados por las vías factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), especies reactivas de oxígeno (ROS), Akt/mTor, mutante de p53 y MAPK, Modificado de Li y col., 2019.

La hiperglucemia facilita la activación de diversas rutas bioquímicas como la de PKC, hexosaminas, polioles y la glicación de diversas moléculas, conduciendo a la producción de lesiones intracelulares. En la mitocondria, lo anterior, conlleva a la generación de ROS, como el radical superóxido, el radical hidroxilo, y el peróxido de hidrogeno, promotores del daño al genoma, mediante la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), el factor inducible de hipoxia alfa (HIF1 α), el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT 3) y MAPK, que activan la expresión de genes de crecimiento, proliferación, migración e inhibición de apoptosis (Duan y col., 2014),

Adicionalmente, las células tumorales presentan una reprogramación metabólica, denominado efecto de Warburg. En donde las células tumorales presentan un consumo incontrolado de glucosa, que es metabolizada en lactato, bajo condiciones aeróbicas. Este efecto desencadena la activación de los mecanismos de proliferación, invasión, migración, inhibición de la apoptosis y quimioresistencia (Li y col., 2019; Warburg, 1965).

Aunado a lo anterior, la hiperglucemia favorece la síntesis y disponibilidad de diversos factores de crecimiento como el EGF, el TGF- β e IGF-1, permitiendo la activación de la PKC y los receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPAR) de las isoformas alfa y gamma, involucradas en el crecimiento tumoral en células de mama. Además activan a las proteína cinasas dependientes de ciclinas de tipo 2, la ciclina A, la ciclina E, al factor de crecimiento E2F que regulan el ciclo celular en las células tumorales, de igual forma se inducen a las metaloproteínas (MMPs) 2 y 9 encargadas de los procesos de migración y metástasis tumoral (Li y col., 2019; Ryu y col., 2014).

4. Modificaciones epigénéticas.

Las modificaciones epigenética se define como cambios heredables en la estructura y expresión genética derivada de alteraciones en la estructura de la cromatina, del DNA o por síntesis de diversas moléculas no codificantes, desencadenando una transformación del fenotipo celular (García Robles y col., 2012).

Estudios *in vitro* han reportado que las altas concentraciones de glucosa inducen modificaciones epigénéticas dentro de las células tumorales. Algunas de ellas, son: metilación del DNA, modificaciones del nucleosoma (metilaciones y acetilaciones de histonas), y la síntesis de RNA's no codificantes. Las cuales son conservadas pese a una normalización de las concentraciones de glucosa, por lo que se le ha denominado como memoria hiperglucémica (Lee y col., 2016).

Las modificaciones en la expresión genética mediada por la adición de un grupo acetil o metil a las histonas, conlleva cambios en las interacciones del nucleosoma con el DNA, que facilitan o inhiben la transcripción de genes (Wellen y Thompson, 2012; Seligson y col., 2005; Pogribny y col., 2007; Hitchler y Domann, 2009; Tornaletti y Pfeifer, 1995).

Mientras los RNA's no codificantes (ncRNA) son moléculas reguladoras de la expresión genética y se clasifican en dos grandes categorías; los RNAs pequeños y los RNAs largos. Los RNA's pequeños agrupa a un gran número de moléculas no codificantes, como los micro RNA's (microRNA's), pequeños RNA nucleolares (snoRNA's) y los pequeños RNA's de interferencia (siRNA's), las cuales regulan los procesos de transcripción, maduración y transcripción de los RNA's codificantes.

Por otro lado los ncRNA's de cadena larga (lncRNA's) son un grupo heterogéneo de moléculas con una longitud de más de 200 pares de bases, que pueden o no, presentar una cola poli-A, junto con una caperuza en su extremo 5', similar a los RNA's mensajeros, y se encargan de regular los procesos de transcripción y traducción. Existe una gran variedad de lncRNA's, por lo que se ha establecido una nomenclatura basada en la ubicación y composición de la región codificante, que puede ser de solapamiento, bidireccional o divergente, intrónica, intergenética y de sentido o antisentido, de igual forma toma en cuenta el mecanismo de acción que tienen, como son los de andamiaje, de regulación epigenética, de promotores y de señuelos (tabla 2). Sin embargo ¿no se conoce? la función de los ncRNA en el desarrollo y progresión del cáncer, ni de los cambios que sufren estas moléculas bajo ciertas condiciones (Spurlock y col., 2016; Dahariya y col., 2019).

Tabla 2. Mecanismo de acción de los RNA´s largos no codificantes

| TIPO | MECANISMO DE ACCIÓN. |
|----------------|---|
| ANDAMIO | Modificaciones de cromatina y epigenéticas a través del reclutamiento de moléculas remodeladoras de cromatina. |
| SEÑAL | Activación de la transcripción y translocación de microRNA encargados de la activación, modulación de la expresión genética. |
| GUÍA | Procesamiento de los precursores de microRNA´s y otras moléculas pequeñas de RNA, a través de corte/empalme, edición, rotación y arresto de estas moléculas. |
| SEÑUELO | Inhibición de la transcripción y degradación de RNA mensajeros, de la interacción entre RNA-RNA, e inhibición para su transcripción y translocación de microRNA´s |

Antecedentes.

En el año 2001 Bartucci y colaboradores estudiaron la señalización y función diferencial del IGF-IR en las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, en donde MCF-7 presentan una mayor sensibilidad a los efectos de IGF *in vitro*, el cual activa a las moléculas PI3K, AKT, y MAPKS (ERK 1/2 y p38), involucradas en la proliferación, migración e invasividad, mientras que las células MDA-MB-231 no presentan una respuesta a esta hormona. Por otra parte Massur y colaboradores reportaron que altas concentraciones de glucosa e insulina modifican los niveles de expresión transcripcionales y proteicos involucrados en la migración, adhesión y proliferación en distintas líneas tumorales. Ellos identificaron como responsables a las ciclinas A1 y E, a la proteína E2F, a la proteína cinasa C alfa (PKC α) y a la cadherina VE, como reguladoras de la transición del ciclo celular, de los procesos proliferación y de migración y metástasis tumoral. Por otro lado, las altas concentraciones de glucosa e insulina incrementan la formación de ROS en las células MCF-7. La formación de ROS permite la inducción de los procesos de migración e invasión tumoral, a través de la transición epitelio mesenquima (TEM) que requiere la expresión y activación del activador de plasminogeno de tipo uroquinasa (uPA), de su receptor (uPAR) y del inhibidor del activador del plasminogeno 1 (PAI-1) (Flores-López y col., 2016; Viedma-Rodríguez y col., 2017). Todos estos mecanismos han favorecido cambios asociados con el proceso de regulación epigenética, sin embargo no se conocen todos los cambios epigenéticos involucrados en el desarrollo de cáncer de mama.

Finalmente en 2018 Li y colaboradores estudiaron la sobre expresión del microRNA-301a (mir301a) en el carcinoma prostático positivo a receptores de andrógenos bajo un ambiente de alta glucosa. El cual favorece la proliferación tumoral, a través de la inhibición de la expresión de genes p21 y smad4, encargados del arresto en la fase G1 del ciclo celular, además de permitir un estado de resistencia a los tratamientos convencionales contra el cáncer de próstata (positivos a receptores androgénicos) en comparación con los tumores que no expresan estos receptores.

Justificación

El cáncer de mamá es la principal afección de mujeres y la cuarta causa de muerte en mujeres a nivel mundial (OMS, 2016). Se estima que cada año se diagnostican un millón de nuevos casos y se pronostica que estas cifras se dupliquen en los siguientes años. En México el cáncer de mamá se ha incrementado gradualmente en las últimas dos décadas, pasando de 10.76 casos por 100,000 mujeres a 26.1 por cada 100,000 mujeres, siendo actualmente un problema de salud pública (Cárdenas-Sánchez, 2019). Aunado a esto en los últimos años diversos estudios epidemiológicos han reportado que pacientes con diabetes mellitus tienen una mayor predisposición al desarrollo de cáncer de mamá, sin embargo existen diversas interrogantes en la relación entre ambas enfermedades, por ello es necesario su estudio. El propósito del presente trabajo es la determinación de los cambios en el transcriptoma que se encuentran involucrados en la progresión del cáncer, dentro de la línea celular MCF-7 en un microambiente de hiperglucemia e hiperinsulinemia, así como en la determinación de biomarcadores predictivos de un estado de resistencia a los tratamientos del cáncer de mama.

Hipótesis.

Un estado de hiperinsulinemia conlleva a modificaciones en el transcriptoma celular, que favorecen el desarrollo de cáncer de mamá, a través de la regulación de los procesos de proliferación, invasión/migración, metástasis y resistencia a fármacos.

Objetivos.

Objetivo general.

- Determinar la acción de la insulina en el transcriptoma de las MCF-7 en un microambiente de hiperglucemia.

Objetivos particulares.

- ❖ Establecer los cambios en la expresión de los RNA's codificantes inducidos por insulina.
- ❖ Establecer los cambios en la expresión de los RNA's no codificantes inducidas por insulina en un microambiente de hiperglucémico.
- ❖ Establecer la respuesta al tamoxifeno inducidos por insulina en un microambiente hiperglucémico.

Metodología.

Cultivo de células MCF-7.

La línea celular MCF-7 (procedente de ATCC: The Global Bioresource Center) se propagó en frascos de cultivo celular de 75 cm² (Corning, Iowa, EEUA), con 10 ml de medio de cultivo DMEM/F12 (Biowest), suplementado con 1% de antibióticos (100 µg/ml de ampicilina y 100 µg/ml estreptomina), el cultivo fue incubado a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5 % de CO₂ (Cámara de CO₂ NAPCO 6500) hasta observar un 80% de confluencia. Posteriormente se procedió a cultivar las células en cajas Petri de 100x20mm (Corning, Iowa, EEUA) bajo las dos condiciones de estudio; la primera de alta glucosa (HG), donde el medio DMEM fue suplementado con 30 mM de dextrosa. La segunda es de alta glucosa con insulina (HG/I), el medio DMEM es suplementado con 30 mM dextrosa y con 80 nM de insulina. Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 48 horas. Las células se recolectaron por tripsina cuando se observó un 80% de confluencia.

Aislamiento de RNA de la línea MCF-7 expuestas a HG y HG/I.

Se realizó la extracción del RNA mediante la técnica de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski, 1993), utilizando el reactivo de Trizol (Ambion, EUA).

A los cultivos celulares se les retiró el medio DMEM-F-12 y se agregó 1 ml de reactivo de Trizol, para la homogeneización. El homogenado se transfirió a un tubo de Eppendorf (Corning, EUA) de 1,5 ml y se le adicionó 200 µl de cloroformo y se centrifugó a 8,000 r.p.m. durante 10 minutos, obteniéndose dos fases. La fase superior fue separada a un nuevo tubo para la precipitación total del RNA, por la adición de 500 µl de isopropanol y centrifugación a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos. Posteriormente se le agregó a la pastilla 1 ml de etanol al 75%, para después centrifugar la muestra durante 10 minutos a 13,500 r.p.m y la pastilla fue resuspendida en 40 µl agua con dietilpircarbonato (DEPC) para su almacenamiento en tubos de Eppendorf estériles a -70 °C. Finalmente se evaluó la calidad y cantidad del RNA aislado (de acuerdo a la relación A260/280). Para ello se

utilizó el equipo NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). De igual forma se evaluó la integridad del RNA total aislado mediante el método de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Microarreglo de cDNA.

El análisis de los cambios en la expresión del transcriptoma de la línea MCF-7 expuesta a las condiciones anteriormente descritas, se realizó mediante el microarreglo GeneChip (transcriptoma humano) HTA 2.0 array afimetrix (Thermo Scientific, EEUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este diseño de matriz ofrece el análisis de expresión a nivel de gen al proporcionar la cobertura y la precisión necesarias para detectar los cambios en la abundancia relativa de todas las isoformas de transcripción conocidas producidas por un gen, además contiene >6,0 millones de sondas, distribuidas en 10 matrices, que cubren transcripciones codificantes y no codificantes obtenidas de las bases de datos RefSeq, Vertebrate Genome Annotation (Vega) database, Ensembl, MGC Mammalian Gene Collection (v10), UCSC Known Genes, www.noncode.org, UCSC lincRNA transcripts, lincRNA db y Broad Institute, Human Body Map lincRNAs, and TUCP (transcripts of uncertain coding potential) catalogo. Esta metodología se realizó en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, en el área de Genética Humana, con el apoyo de la Dra. Ruth Ruiz Esparza Garrido.

El análisis de los cambios en los niveles de expresión obtenidos del microarreglo se realizó mediante el software Transcriptome Analysis Console (TAC) Software version 4.0.2 (ThermoFischer Scientific), el cual realiza evaluaciones estadísticas de los cambios en la expresión, genera listas de los diferentes transcritos que hibridaron con las sondas presentes en el microarreglo de acuerdo a los cambios en los niveles de expresión, muestra los diversos eventos de corte y empalme de cada transcrito y genera un mapa de calor de todos los transcritos identificados.

Determinación de la concentración letal media (CL50) de tamoxifeno.

Se cultivaron en placas de 96 pozos (Corning™ Costar, EUA) 6,000 células por pozo, en 100 µl de medio DMEM/F12, durante 24 horas para su confluencia. Posteriormente se retiró el medio cultivo y se le adicionó medio HG (glucosa 30 mM,

10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos) con tratamiento con tamoxifeno (10, 20, 30, 40, 50, y 60 μM), y se incubaron durante 48 horas. A continuación se determinó la cantidad de células por medio de la incorporación del colorante cristal violeta (Kueng y col., 1989). Para ello, se retiró por completo el medio de cada pozo y se les añadieron 50 μl de cristal violeta al 0.5% durante 20 minutos, después se retiró el colorante y se dejó secar al aire, para finalmente adicionarles 200 μl de metanol y leer en un lector de placas para Elisa iMARK Microplate Reader (BioRad, Berkley, California, EEUA) a 595 nm.

Efecto de la insulina sobre la toxicidad del tamoxifeno en las células MCF-7.

El estudio del papel de la insulina sobre el efecto citotóxico de la dosis de 32.5 μM de tamoxifeno en las células MCF-7 en un microambiente de hiperglucémico, se realizó con base en el procedimiento de propagación, cultivo; adicionando 100 μl de los tratamientos descritos en la tabla 3 y la determinación de la cantidad celular por cristal violeta descrito en el apartado anterior.

Tabla 3. Descripción de los tratamientos utilizados.

| Tratamiento | | Contenido |
|--|--------------|--|
| Normo glucosa | NG | Medio DMEM |
| Alta Glucosa | HG | Medio DMEM 30 mM de dextrosa |
| Normo glucosa con insulina | NG + I | Medio DMEM 5 mM de dextrosa con 80 nM de insulina |
| Alta glucosa con insulina | HG + I | Medio DMEM 30 mM de dextrosa y 80 nM de insulina |
| Normo glucosa con insulina y tamoxifeno | NG + I + TAM | Medio DMEM 5 mM de dextrosa con 80 nM de insulina y 32.5 μM de tamoxifeno |

Alta glucosa con insulina y
tamoxifeno

HG + I + TAM

Medio DMEM 30 mM de dextrosa, 80 nM
de insulina y 32.5 μ M de tamoxifeno

Efecto de la insulina sobre la viabilidad de las células MCF-7 en un microambiente de hiperglucémico.

La acción de la insulina sobre la viabilidad las células MCF-7 fue por medio del ensayo de exclusión de azul Tripano (Sigma, EUA) al 0.4%.

Se sembraron en placas de 24 pozos 100,000 células MCF-7 en cada pozo, bajo las condiciones de propagación y cultivo descritos con anterioridad, posteriormente se le añadió 100 μ l de cada tratamiento descrito en la tabla 3. A continuación se retiraron los medios y se recuperaron las células, se centrifugo a 5,000 r.p.m. durante 5 minutos en la centrifuga DM04125 (Science MED, Finland Technology, Lakeway Texas, EEUUA) y se resuspendieron en un mililitro de medio de alta glucosa. Después se tomaron 50 μ l de cada suspensión y se colocaron en tubos Eppendorf de 1 ml, a los cuales se les añadieron 50 μ l de azul Tripano al 0.4 %, estableciendo así una proporción 1:1. Finalmente se tomó 10 μ l de cada muestra y fue colocado en un hemocitómetro de Neubauer para el conteo de células vivas y muertas determinando así el porcentaje de viabilidad celular.

Análisis estadístico.

Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey en el programa GraphPad Prism v. 8.0.2.

Resultados.

Aislamiento del RNA

Con la finalidad de determinar los cambios en la expresión de las células MCF-7 se procedió a la extracción del RNA, evaluando su rendimiento e integridad. La condición de alta glucosa presentó un valor de 1.80, para la relación 260/280, con una concentración de 2963.2 ng/l (figuras 8), por otro lado el tratamiento de alta glucosa con insulina la relación de 260/280 fue de 1.95, con una concentración de 2130.8 (figuras 9). Posteriormente se evaluó la integridad a través de un gel de agarosa al 2% y electroforesis, identificando las subunidades ribosomales, 18's y 28's en las condiciones de HG y HG + I observándose una nula degradación del RNA.

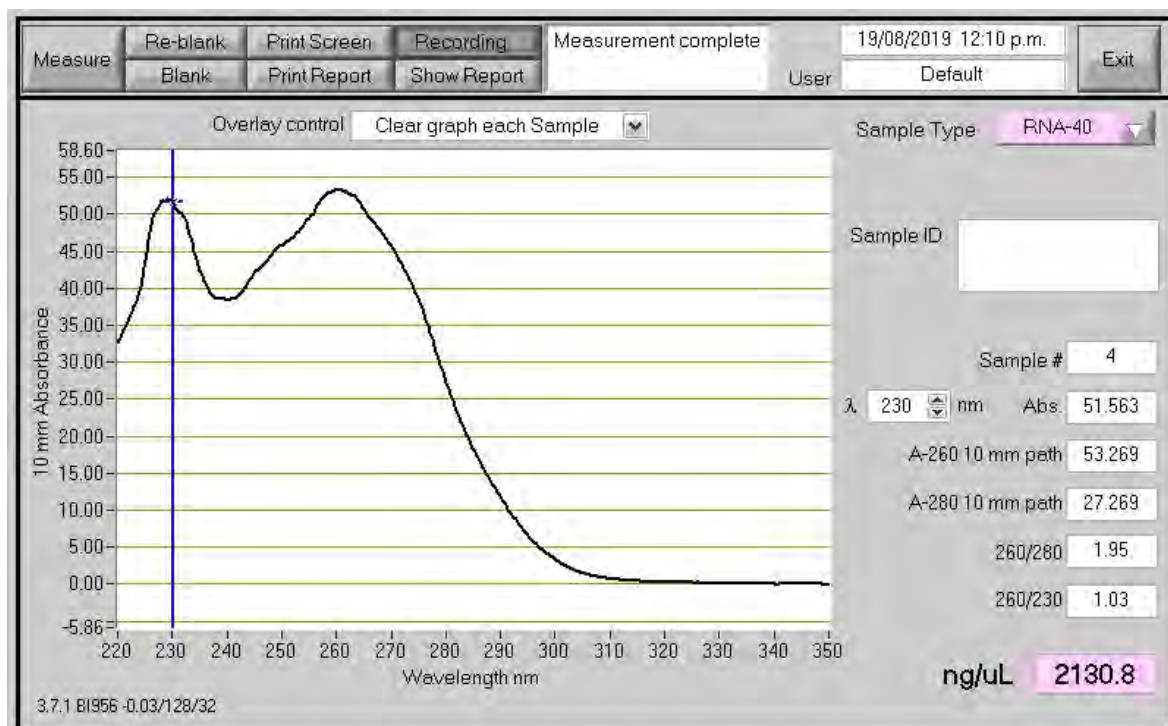


Figura 8. Evaluación del RNA extraído de la línea celular MCF-7 expuesta a hiperglucemia. La presencia de los dos picos de absorbancia, donde la primera corresponde a la longitud de 230 nm; absorbancia de reacción de los disolventes orgánicos utilizados durante el procedimiento de extracción, mientras el segundo pico es a 260 nm indicador de la presencia de las bases nitrogenadas del RNA.

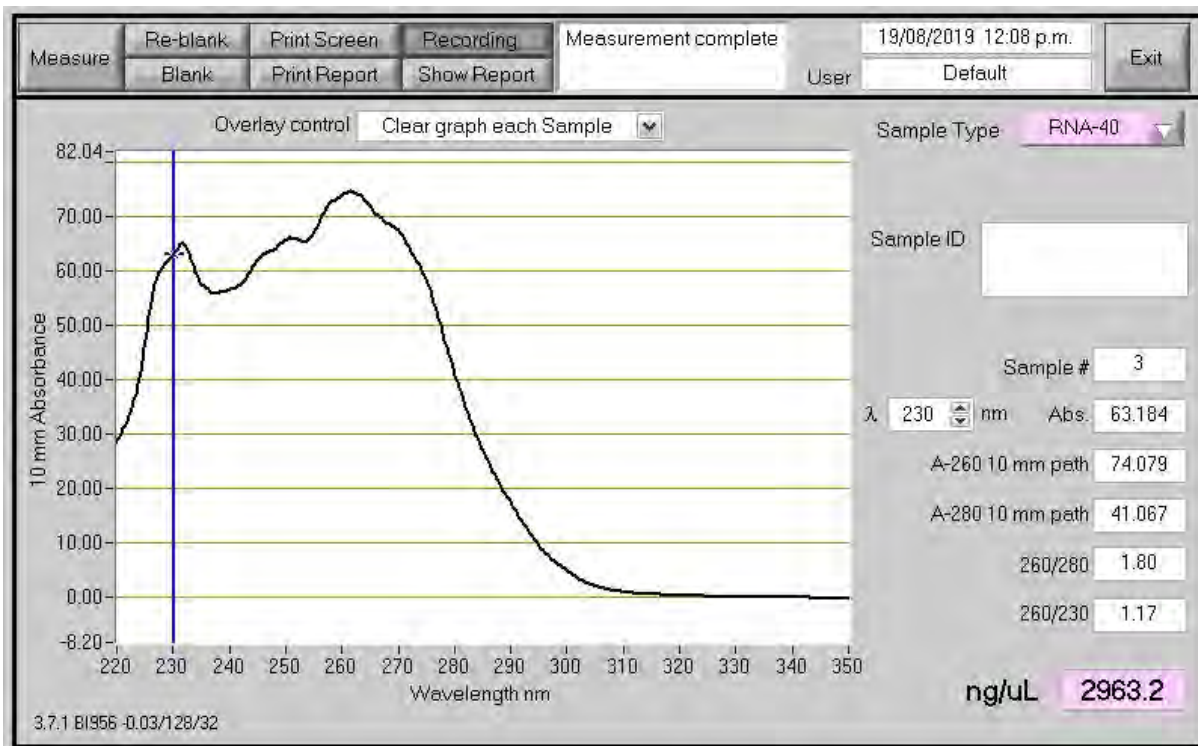


Figura 9. Considere lo señalado en la figura 8.

Determinación de los cambios transcripcionales por microarreglo

De un total de 67,528 transcritos evaluados, 1,942 presentaron una tasa de cambio \geq que 2 entre ambos tratamientos. Las insulina indujo la sobre expresión de 1,012 y una baja expresión de 930 transcritos. De los 1,012 transcritos regulados a la alta, se encontró que el 16% corresponde a no codificantes y el 84% son codificantes (figura 10).



Figura 10. Cambios en la expresión del transcriptoma inducidos por la insulina en las células MCF-7. De los 1,012 transcritos sobreexpresados 850 son codificantes, representando el 84% y 162 no lo son, siendo el 16%. Por otro lado de los 930 transcritos subexpresados 716 son codificantes, siendo el 77% y 214 no, representando el 23%.

El entendimiento de las relaciones existentes entre los cambios de la expresión genética de ambas condiciones se realizó a través del agrupamiento jerárquico o un mapa de calor (figura 11), en donde se agrupan los genes de acuerdo a sus valores de expresión, siendo los rangos de 20 como máximo y 2.5 como mínimo, de acuerdo a los valores estadísticos de significancia para los cambios de expresión entre las muestras. Esta agrupación facilita el conocer el comportamiento que tiene cada gen bajo cada tratamiento.

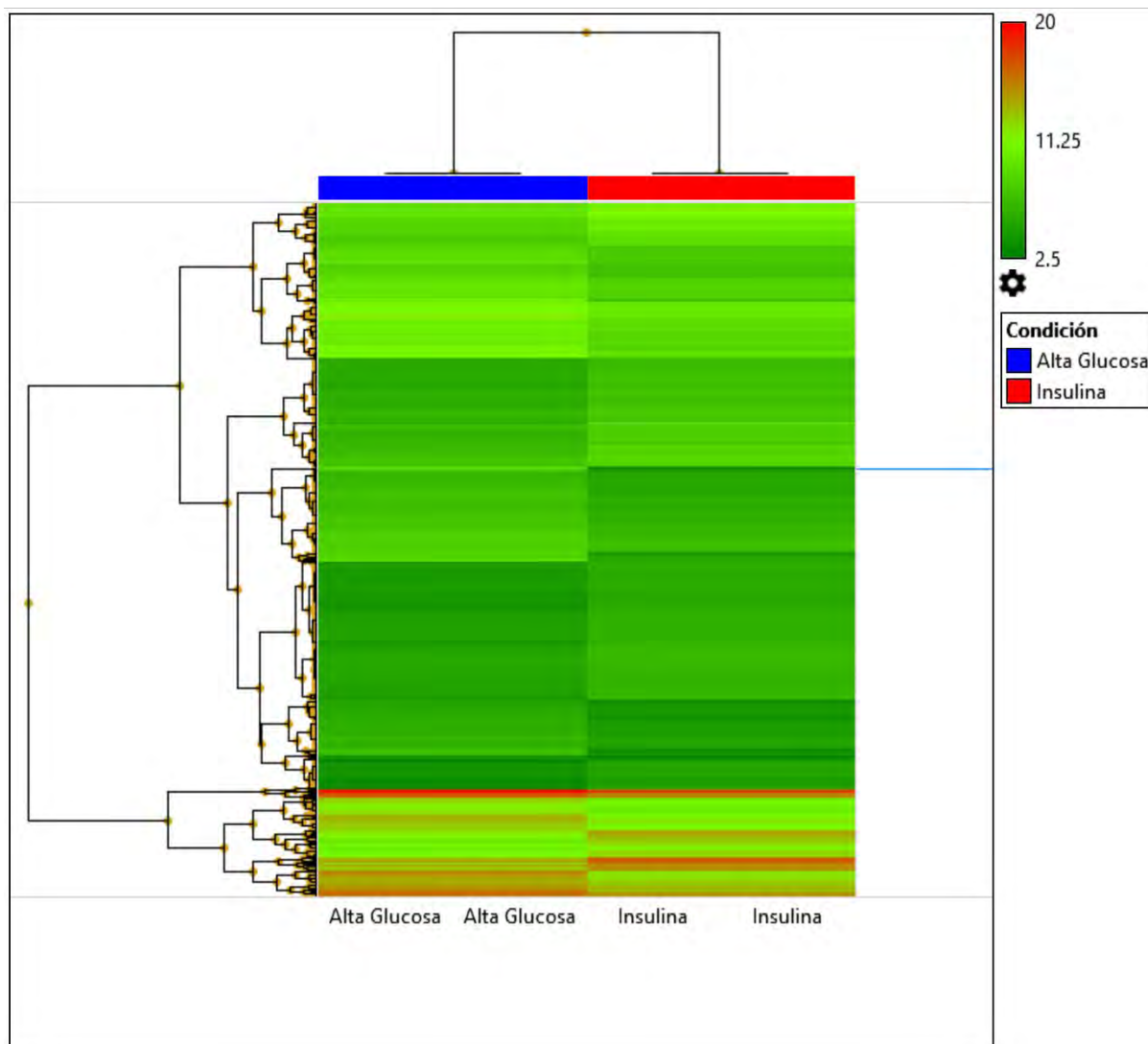


Figura 11. Mapa de calor. Donde se agrupan los transcritos de acuerdo a sus niveles de cambios en la expresión que estén entre los valores 20 y 2.5.

Del análisis comparativo entre ambas condiciones se seleccionaron todos aquellos RNA's codificantes (mensajeros) y no codificantes, que presentaron cambios entre 2 y 10 niveles en la tasa de expresión a la alza y a la baja inducidos por la insulina en un microambiente hiperglucémico, además se consideró que estos genes se encontraran involucrados en alguna fase de la carcinogénesis; participando en proliferación, migración, invasión, inhibición de la apoptosis, o favoreciendo la resistencia a fármacos (tablas 4-7). Los principales transcritos modificados a la alza, son IGFBP5 y el RNA largo no codificante 1016 (LINC01016), teniendo una tasa de cambio de 5.06 y 5.49, respectivamente. Mientras que los transcritos de la ribonucleasa P con un componente H1 del RNA (RPPH1) y el miembro 5 del

translocador de nucleótidos de adenina (SLC25A5) fueron los que tuvieron la tasa de cambio a la baja, con -8.01 y -8.5.

Tabla 4. Transcritos codificantes modificados a la alza inducidos por insulina en las células MCF-7 en medio hiperglucémico.

| Nombre | Gen | Tipo | Función asociada al cáncer | Tasa de cambio | Valor de p |
|---|------------|-------------------------|---|----------------|------------|
| Proteína de unión a IGF número 5 | IGFBP5 | Proteína de enlace | Promueve la proliferación, ciclo celular, resistencia a fármacos e inhibición de la migración. | 5.06 | 3.42E-38 |
| Homeobox A13 | HOXA13 | Factor de transcripción | Promueve la proliferación, invasividad y metástasis | 3.55 | 1.05E-41 |
| Receptor colinérgico nicotínico alfa 7 | CHRNA7 | Receptor | Receptor a acetil colina involucrado en proliferación, migración e invasión | 2.62 | 2.96E-38 |
| Pin | PNN | Proteína | Proliferación, migración, invasividad y resistencia a quimioterapia | 2.61 | 2.09E-41 |
| Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR Beta 1 | HLA-DRB1 | Receptor | Mutaciones en ciertos aminoácidos favorece la susceptibilidad de ciertos cánceres | 2.5 | 5.91E-38 |
| Factor de transcripción con dedo de zinc 460 | ZNF460 | Proteína | Requiere de la unión de miR-3646 para la activación de proliferación, muerte celular, división celular, mitosis y el metabolismo. | 2.49 | 2.57E-38 |
| Carioferina alfa 3 (importina alfa 4) | KNPA4 | Proteína | Promueve la proliferación, invasividad y resistencia | 2.41 | 2.03E-37 |
| Succinato deshidrogenasa | SDH | Enzima | Deficiencia promueve la proliferación, TEM, invasividad y resistencia | 2.39 | 6.72E-38 |
| Inhibina beta B | INHBB | Hormona | Inhibe la migración celular y promueve la carcinogénesis al ser el blanco de FOXL2 | 2.21 | 2.61E-37 |
| Receptor de progesterona | PGR | Receptor | La unión a su ligando permite la transcripción de genes proliferativos, de crecimiento y migración celular | 2.19 | 2.69E-37 |
| Anexina A9 | ANEXINA A9 | Proteína | Promueve la invasión y metástasis | 2.18 | 3.48E-41 |
| Transportador de glucosa facilitador independiente de la insulina | SLC2A12 | Transportador | Induce la migración, crecimiento y migración celular | 2.18 | 3.49E-41 |
| Peptidilpropil isomerasa G | PPIG | Enzima | Reguladora del ciclo celular | 2.17 | 3.81E-38 |
| Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2 | TANC2 | Gen | Promueve la proliferación y supervivencia | 2.09 | 2.38E-37 |
| Miembro 1 de la familia SMAD | SMAD 1 | Factor de crecimiento | Indicador de incidencia en cáncer; invasividad, proliferación | 2.08 | 2.57E-37 |

| | | | | | |
|---|-------|--------------------|--|------|----------|
| Interferon alfa 7 | IFNA7 | Citocina | Involucrado en la supervivencia celular | 2.06 | 4.51E-38 |
| Translocación de sarcoma sinovial , cromosoma 18 | SS18 | Proteína ribosomal | Promueve la proliferación y migración | 2.04 | 2.57E-37 |
| Dominio de unión a la cinasa 1 H3 | SBK1 | Proteína | Su desregulación provee supervivencia | 2 | 5.00E-38 |
| POTE anquirina miembro de la familia de dominio E | POTEE | Proteína | Biomarcador de la etiología del cáncer de mama | 2 | 3.61E-37 |

Tabla 5. Transcritos no codificantes modificados a la alza inducidos por insulina en las células MCF-7 en medio hiperglucémico.

| Nombre | Gen | Tipo | Función asociada al cáncer | Tasa de cambio | Valor de p |
|--|-----------|-----------|---|----------------|------------|
| RNA no codificador proteico intergénico largo 1061 | LINC01061 | ncInRNA | Proliferación, ciclo celular, invasividad, inhibición de apoptosis | 5.49 | 3.03E-38 |
| microRNA 1252 | miR-1252 | micro RNA | Proliferación y migración | 4.87 | 6.62E-39 |
| RNA antisentido 1-DSCAM | DSCAM-AS1 | ncInRNA | Proliferación celular, la migración y la capacidad de invasión | 3.17 | 5.67E-37 |
| RNA no codificador proteico intergénico largo 1001 | LINC01001 | ncInRNA | Proliferación y migración | 3.11 | 1.38E-41 |
| microRNA 374a | miR-374a | micro RNA | Migración celular e invasividad | 3 | 1.62E-38 |
| microRNA 1243 | miR-1243 | micro RNA | Inhibición TEM y sobreexpresión de E-cadherina | 2.91 | 9.54E-38 |
| Transcriptor 1 del ensamblaje de parapectle nuclear | NEAT1 | ncInRNA | Proliferación, migración, invasividad y resistencia | 2.86 | 1.30E-37 |
| microRNA 1243 | miR-1290 | micro RNA | Proliferación, invasividad y migración | 2.61 | 2.09E-41 |
| microRNA 1243 | miR-1322 | micro RNA | Inhibición del gen antitumoral ECRG2 en cáncer esofágico. | 2.52 | 1.78E-37 |
| Transcrito 1 de metástasis de pulmón asociado a adenocarcinoma | MALAT1 | ncInRNA | Proliferación, invasividad, migración y resistencia de fármacos | 2.44 | 7.90E-37 |
| RNA no codificador proteico intergénico largo 641 | LINC00641 | ncInRNA | Vía de señalización MAPK en proliferación y migración celular; inhibe tumorigénesis, metástasis y resistencia a fármacos. | 2.44 | 2.71E-38 |
| microRNA 4789 | miR-4789 | micro RNA | Biomarcador del cáncer colorrectal | 2.4 | 2.83E-38 |
| microRNA 5047 | miR-5047 | micro RNA | Expresión a la baja en cáncer colorrectal favoreciendo mutaciones en intermediarios de la vía TGF-Beta en la línea MDA27ad-TA | 2.4 | 1.55E-37 |

| | | | | | |
|---|------------|-----------|---|------|----------|
| microRNA 135A2 | miR-135A2 | micro RNA | Baja regulación cuando se silencia HUR en cáncer tiroideo, permitiendo la inducción de apoptosis y silenciamiento de la proliferación celular | 2.32 | 3.12E-38 |
| microRNA 186 | miR-186 | micro RNA | Proliferación y migración; antitumoral inhibe proliferación y migración en pulmón y mamá | 2.32 | 3.14E-38 |
| microRNA 1284 | miR-1284 | micro RNA | Inhibe el crecimiento, proliferación celular, TEM, migración e induce apoptosis | 2.15 | 3.94E-38 |
| microRNA 1299 | miR-1299 | micro RNA | Inhibidor de la proliferación celular, migración y metástasis | 2.13 | 3.75E-41 |
| RNA no codificador proteico intergénico largo 115 | LINC00115 | ncInRNA | Agente tumorgénico, favorece la proliferación celular y es regulado por TGF- β | 2.09 | 1.02E-37 |
| RNA antisentido 1 VPS9D1 | VPS9D1-AS1 | ncInRNA | Proliferación y migración | 2.06 | 4.52E-38 |
| RNA no codificador proteico intergénico largo 566 | LINC00566 | ncInRNA | Afecta las vías de señalización de mTOR, del complemento y de coagulación a través de la regulación génica. | 2.06 | 4.20E-41 |
| microRNA 520D | miR-520D | micro RNA | Inhibición de la proliferación, migración e inhibición | 2.05 | 4.24E-41 |

Tabla 6. Transcritos codificantes modificados a la baja inducidos por insulina en las células MCF-7 en medio hiperglucémico.

| Nombre | Gen | Tipo | Función asociada al cáncer | Tasa de cambio | Valor de p |
|--|----------------|----------------------------|---|----------------|------------|
| Miembro 5 del translocador de nucleotidos de adenina | SLC25A5 | ncInRNA | Inhibición de la proliferación, inducción de la apoptosis, y del ciclo celular | -8.5 | 2.9E-42 |
| Ribonucleasa P con un componente H1 del RNA | RPPH1 | Enzima | Clivaje de mRNA para inhibición de su traducción | -8.01 | 4.96E-42 |
| Proteína ribosomal L9 | RPL9 | Proteína ribosomal | Promueve la proliferación TEM | -3.94 | 5.16E-38 |
| Ornitina descarboxilasa 1 | ODC | Enzima | Favorece la transformación celular, la invasión tumoral y la angiogénesis | -3.19 | 1.82E-37 |
| GTPasa GNP-loop 1 | GPN1 | Transportador | Exportador de las proteínas Ser5, CTD fosfatasa, RPAP2, | -3.02 | 1.47E-41 |
| Proteína de unión a oxisterol de tipo 5 | OSBPL5 | Proteína de unión | Promueve la invasividad tumoral y la proliferación celular por mTor | -3.02 | 1.6E-38 |
| Subunidad 27 del complejo mediador | MED27 | Proteína | Proliferación celular, progresión del ciclo celular por AKT / MAPK y NF- κ B / iNOS e inhibición de la apoptosis | -2.95 | 9.22E-38 |
| Proteína 1A de choque térmico de 70 kDa | HSP70 (HSPA1A) | Proteína de choque térmico | Facilitan el plegamiento de numerosas proteínas oncogénicas, mantienen el potencial proliferativo e inhiben la apoptosis, | -2.65 | 2E-41 |

| | | | | | |
|--|--------------|-------------------------|--|-------|----------|
| Miembro B de la familia con secuencia similar a 83 | FAM83B | Proteína | Promueve la tumorigenesis | -2.59 | 2.32E-38 |
| Cluster de histona 1 de H1D | HIST1H1D | Histona | Promueve la síntesis de la histona H1H1 para el empaquetamiento del DNA | -2.58 | 2.15E-41 |
| Homologo beta de RAD | RAD54B | Proteína | Promueve la proliferación celular, inhibe la apoptosis, | -2.51 | 5.87E-38 |
| Homólogo del oncogén viral de mieloblastosis aviar V-myb | MYB | Factor de transcripción | Promueve la proliferación celular, diferenciación, tumorigénesis, metástasis e inhibe la apoptosis | -2.47 | 2.42E-41 |
| Subunidad 3 (gamma) de la chaperona CTP | CCT3 | Chaperona | Apoya el ciclo celular y la proliferación celular | -2.42 | 1.51E-37 |
| Cliclina T1 | CNNT1 | Proteína | Inhibe la apoptosis y promueve la proliferación celular | -2.41 | 6.58E-38 |
| Ciclina B1 | CCNB1 | Proteína | Inhibe los procesos de proliferación, invasividad, metástasis y resistencia a fármacos; | -2.35 | 3.84E-37 |
| Cinasa serina/treonina 3 | SKT3 (MST-2) | Enzima | Promueve los proceso de proliferación, invasividad y migración, inhibe la apoptosis | -2.35 | 3.87E-37 |
| Subunidad 3 de la DNA polimerasa epsilon | POLE3 | Componente enzimatico | Replicación del DNA | -2.34 | 3.03E-38 |
| Calpastatina | CAST | Proteína | Regula los procesos de migración y metástasis | -2.34 | 3.03E-38 |
| Domino de cremallera básica de leucina y dominios W2 1 | BZW1 | Factor de transcripción | Regula la proliferación y el ciclo celular | -2.28 | 4.19E-37 |
| Peptidasa específica de ubiquitina 17 | USP17L29 | Enzima | Inactiva a las moléculas p21 y p27 para la activación del ciclo celular | -2.26 | 2.42E-37 |
| Proteína ribosomal S2 | RPS2 | Ribosoma | Biogénesis de ribosomas, asociada a los procesos de crecimiento y supervivencia tumoral | -2.24 | 1.89E-37 |
| Timopopoyetina | TMPO | Citocina | Regulador de los procesos de proliferación, ciclo celular, migración y metástasis | -2.22 | 1.94E-37 |
| Miembro de la familia cinasa C1 | KIFC1 | Enzima | Iniciación y progresión del cáncer | -2.22 | 1.95E-37 |
| Cromodominio helicasa 9 | CHD9 | Componente enzimatico | Inhibidor de la proliferación tumoral | -2.21 | 3.32E-41 |
| Complejo T1 | TPC-1 | Proteína | Involucrado en distintas vías de señalización de la carcinogénesis | -2.18 | 4.81E-37 |
| Ciclo de división celular C25 | CDC25C | Proteína | Regulador del ciclo celular y proliferación | -2.15 | 5.06E-37 |
| Subunidad 3 del factor de splicing 3B | SF3B3 | Proteína | Provee de resistencia contra los tratamientos | -2.14 | 5.12E-37 |
| Subunidad del complejo de | XRCC6 | Proteína | Provee de resistencia contra los tratamientos | -2.14 | 5.13E-37 |

| | | | | | |
|---|--------|----------|---|-------|----------|
| reparación contra rayos X | | | | | |
| Ciclina A2 | CCNA2 | Proteína | Promueve el progreso en el ciclo celular y de resistencia a la acción de fármacos | -2.13 | 5.25E-37 |
| Espectrina beta no eritroica 1 | SPTBN1 | Receptor | Inhibidor de la progresión tumoral | -2.1 | 2.34E-37 |
| Proteína ribosomal L4 | RPL4 | Proteína | Inhibidor de la vía apoptótica MDM2-p53 | -2.08 | 1.73E-36 |
| Regulador del ciclo celular sin ecdisona | ECD | Proteína | Promotor del ciclo celular | -2.08 | 1.40E-45 |
| metilnetetrahidrofolato deshidrogenasa 1 | MTHFD1 | Enzima | Promueve el crecimiento, proliferación y migración celular | -2.05 | 1.40E-45 |
| Proteína 6 inducible por interferón alfa | IFI6 | Proteína | Promueve la invasión y migración | -2.04 | 1.40E-45 |
| Neurofascina | NFASC | Receptor | Requerida para migración e invasividad tumoral | -2.04 | 1.40E-45 |
| RNA cinasa serina/treonina VRK | VRK1 | Enzima | Promueve la apoptosis e inhibe la proliferación celular | -2.03 | 1.40E-45 |
| Clasificación de proteína vacuolar 4 homólogo A | VPS4A | Proteína | Inhibe el crecimiento, proliferación, migración e invasión tumoral | -2.01 | 1.40E-45 |
| La subunidad del proteasoma 26 S PSMD1 | PSMD1 | Proteína | Promueve el progreso del ciclo celular, inhibición de la apoptosis y resistencia a los tratamientos | -2.01 | 1.4E-45 |

Tabla 7. Transcritos no codificantes modificados a la baja inducidos por insulina en las células MCF-7 en medio hiperglucémico..

| Nombre | Gen | Tipo | Función asociada a cáncer | Tasa de cambio | Valor de p |
|--|-----------|----------|---|----------------|------------|
| microRNA 1184-3 | miR1184-3 | microRNA | Promueve la invasividad, migración y angiogénesis en tumores | -2.93 | 1.72E-38 |
| Componente de la RNA telomerasa | TERC | ncInRNA | Promueve el crecimiento celular, inhibe la apoptosis y activa la Telomerasa | -2.83 | 1.01E-37 |
| RNA antisentido MNX1 | MNX1-AS1 | ncInRNA | Promueve la proliferación y migración celular | -2.22 | 3.58E-38 |
| Caja de helicasa 9 (Asp-Glu-Ala-His) | DHX9 | ncInRNA | Unión al RNA largo MDM2 para regular la invasividad y angiogénesis | -2.19 | 2.62E-36 |
| microRNA 1910 | miR-1910 | microRNA | Activador del factor transcripcional TAZ para el crecimiento tumoral | -2.08 | 1.73E-36 |
| RNA no codificador proteico intergénico largo MRPL39 | MRPL39 | ncInRNA | Inhibe el crecimiento, proliferación, migración e invasión celular | -2.05 | 1.40E-45 |

ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD

Una vez establecidos los transcritos sobre-expresados por la acción de la insulina, tanto codificantes como no codificantes, involucrados en la proliferación, supervivencia, migración, metástasis e inhibición del proceso de apoptosis, que facilitan un fenotipo agresivo en las células MCF-7, se procedió a validar el crecimiento en la población celular, la viabilidad celular y la respuesta al tamoxifeno.

Determinación de la CL50 del tamoxifeno

Se determinó la concentración letal media (CL50) para inducir la muerte de la población celular en un 50%. Las células fueron crecidas en medio de alta glucosa y se expusieron en un rango de 10 – 60 μM de tamoxifeno, obteniéndose la CL50 a una concentración de 32.5 μM , de tamoxifeno en un periodo de tratamiento de 48 horas (figura 12). Concentración que fue utilizada en experimentos posteriores.

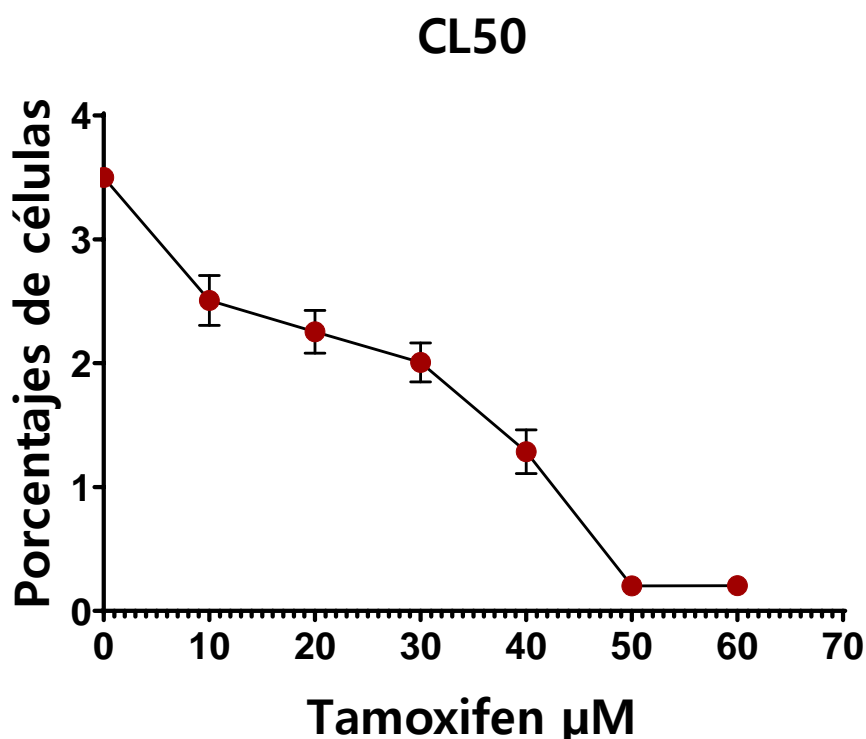


Figura 12. Determinación de la concentración letal media (CL50) de tamoxifeno en las células MCF-7 en un microambiente de hiperglucemia. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos por 48 hrs.

EFFECTO DE LA INSULINA EN LA RESPUESTA A TAMOXIFENO DE LAS CÉLULAS MCF-7 EN UN MEDIO HIPERGLUCÉMICO.

Con la finalidad de evaluar el papel de la insulina en las células MCF-7 en un microambiente de hiperglucemia, se realizó el ensayo de citotoxicidad con cristal violeta al 0.5% (figura 13). En donde la adicción de la insulina favorece el crecimiento poblacional, en un microambiente de normoglucemia. Sin embargo en un medio hiperglucémico la población presenta una absorbancia de 0.53 OD (tratamiento de HG) y al adicionarles insulina pasa a 0.62 OD. Con lo cual se establece que la insulina induce la proliferación de las células MCF-7.

El tamoxifeno es un fármaco que inhibe el desarrollo y elimina las células tumorales de mama; sin embargo su efecto se puede ver atenuado conforme al microambiente celular. Por lo que evaluamos la funcionalidad del tamoxifeno en un microambiente hiperinsulinémico, observando que la insulina proporciona un efecto protector, significativo, a las células tumorales tanto en una condición de alta glucosa como de glucosa normal, con respecto a las condiciones que no tienen insulina, en las cuales la población celular disminuye a la mitad. Sin embargo no se observan diferencias significativas entre los tratamientos de insulina con alta glucosa y alta glucosa, lo cual nos indica que ambas condiciones atenúan los efectos del tamoxifeno sobre las células tumorales (figura 13).

Citotoxicidad

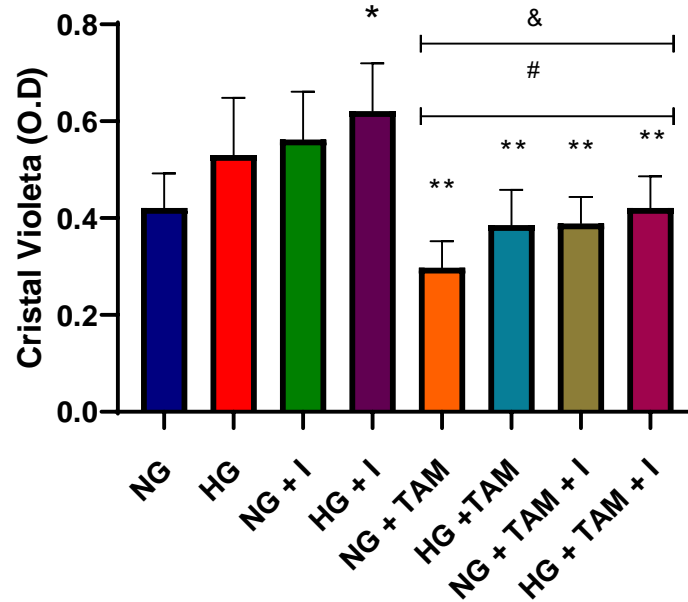


Figura 13. Efecto de la insulina y el tamoxifen en el crecimiento de la población celular en las células MCF-7. La población celular fue determinada por el colorante crista violeta al 0.5%, con una n de 3 repeticiones por tratamiento y siendo analizados con ANOVA con múltiples comparaciones, donde * $p < 0.05$ con respecto al NG; ** $p < 0.05$ con respecto a HG; # $p < 0.05$ con respecto a NG + I; y $p < 0.05$ con respecto a HG + I. Nota: en el eje x debes nombrar lo que mides, no el colorante.

Determinación de la viabilidad celular

Se cuantifico la viabilidad celular mediante el conteo del número de células vivas y muertas de cada tratamiento, (figuras 14). Donde los tratamientos de HG, NG, HG + I y NG + I, presentaron una viabilidad total, en comparación con los tratamientos de NG + Tam y HG + Tam, los cuales presentaron los valores más bajo de viabilidad, siendo del 64 al 71%, respecto a los controles, de igual forma presentaron una mortalidad significativa, al oscilar entre el 29 y 36%. Mientras que los tratamientos con insulina de HG + Tam y NG + Tam mostraron un incremento significativo en la viabilidad, al presentar valores entre el 75 y 80%, junto con una disminución de la mortalidad, al presentar valores entre el 15 y 20%, determinando que la insulina tiene un papel importante en la supervivencia celular.

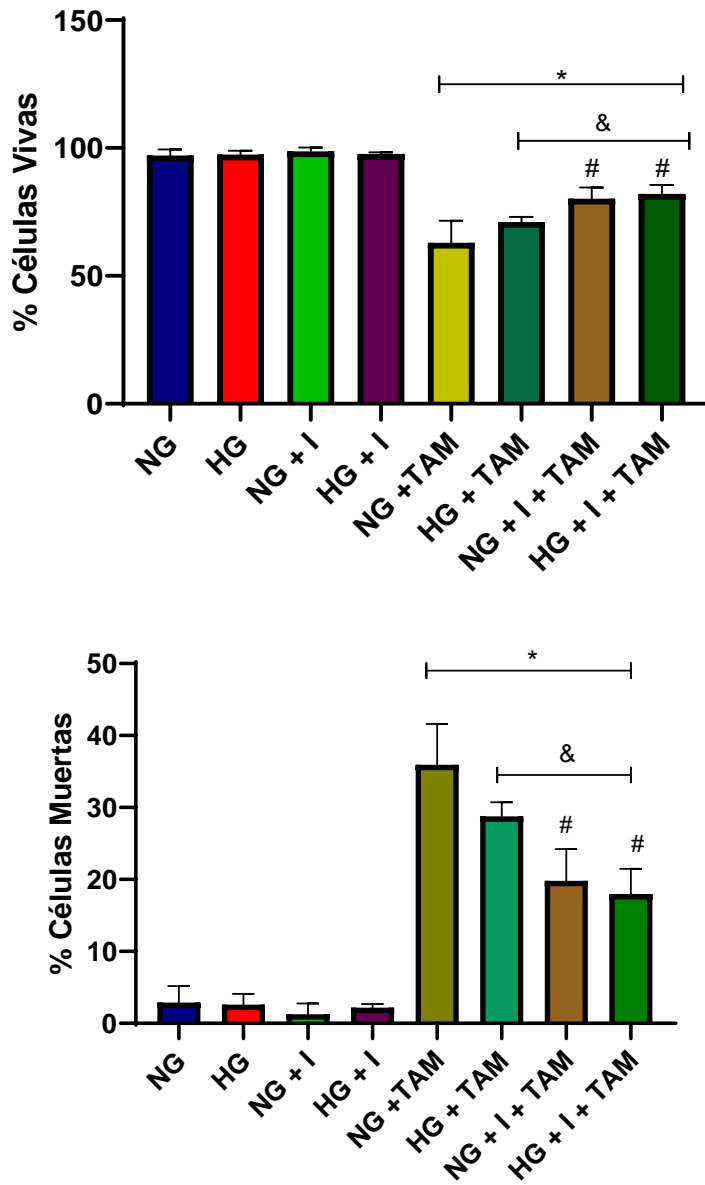


Figura 14. Efecto de la insulina sobre la viabilidad celular en respuesta al tamoxifeno de las células MCF-7 en condiciones de hiperglucemia. La determinación de las células viables fue mediante la técnica de azul tripano al 0.4% y con una n de 3 por tratamiento y siendo analizados con ANOVA con múltiples comparaciones, donde * $p < 0.01$ con respecto NG + TAM; & $p < 0.01$ con respecto a HG; # $p < 0.01$ entre a NG + I + TAM y HG + I + TAM.

Discusión.

El cáncer de mama es una de las principales afecciones y causa de muerte en mujeres a nivel mundial, se estima que alrededor de 2,088,849 de personas presentan esta enfermedad, además de que cada año se diagnostican cerca de un millón de nuevos casos en todo el mundo (OMS, 2016; GLOBOCAN, 2019). El desarrollo y progreso de esta patología se debe a la convergencia de diversos factores, pero en años recientes se ha descrito una relación entre la DM con la incidencia de diversos tipos de cáncer, entre los cuales se encuentran el cáncer de mama positivo a receptores de estrógenos (Larsson y col., 2007).

Las conexiones que existen entre ambas enfermedades aún no se encuentran completamente definidas, por lo que diversos estudios se han dedicado a su determinación. En ellos se ha destacado la importancia de la hiperglucemia e hiperinsulinemia en el cáncer. Lo anterior de acuerdo al estudio de Bartucci y col., en 2001, donde reportaron que el receptor de IGF incrementa la migración y proliferación en las células de cáncer de mama positivas a estrógenos, además demostraron que la eliminación de estos receptores atenúan los procesos antes mencionados e induce la apoptosis, planteándose así una posible asociación entre el desarrollo y progresos del cáncer con la DM. Por lo que el presente estudio tuvo como objetivo la determinación de los cambios en el transcriptoma de las células positivas a receptores de estrógenos MCF-7, expuestas a condiciones de alta glucosa y alta glucosa con insulina. Así como en la determinación de la insulina en los procesos de resistencia a la acción del fármaco tamoxifeno.

En 2011 Massur y colaboradores reportaron que las altas concentraciones de glucosa e insulina inducen la expresión de moléculas involucradas en la proliferación y migración celular, como las ciclinas A1, E2 y la proteína E2F, las PKC β y α , PI3K, las integrinas β 1 y α 2, las cadherinas N y VE, en diversas líneas tumorales. En nuestro estudio encontramos datos similares, puesto que los cambios en el transcriptoma, inducidos por un estado de hiperinsulinemia, son de las moléculas IGFBP5, LINC01016, HOXA3, PNN, KNPA4, ANEXINA A9, MALAT1, TANC2, SS18, miR-1252, DSCAM-AS1, NEAT1, LINC01001, miR374a, miR-1290, miR-186, miR-1284 y VPS9D1-AS1, involucradas en los mismos procesos de proliferación,

migración, metástasis y resistencia a fármacos, principalmente, como se observa en las tablas 4-7.

Además observamos que la insulina con la hiperglucemia incrementan la síntesis del transcrito de la proteína IGFBP5, que es miembro de la familia de proteínas de unión a IGF, y presenta diversa encargan de la regulación de la actividad del IGF, al aumentar o disminuir sus funciones. Estudios previos han reportado que la proteína IGFBP5 se encuentra involucrada en el desarrollo del cáncer de mama positivo a receptores de estrógenos, al incrementar la expresión de los genes codificantes a las IGFBP de tipo 2 y 4, además de regular las vías de proliferación y crecimiento tumoral (Clemmons y col., 1990; Sheikh y col., 1992). La activación de IGFBP5 requiere de la unión de IGF con su receptor en las células tumorales de mama, la interacción ligando receptor induce a la vía de la MAPK, que fosforilan a la proteína intracelular de IGFBP5 y permiten su expresión genética. Entre las funciones que tiene esta proteína es incrementar las concentraciones intracelulares de IGF, así como de su biodisponibilidad en el medio extracelular, favoreciendo la proliferación celular del tumor (Sheikh y col., 1993). Por otra parte se ha reportado que la actividad de IGFBP5 puede ser independiente de IGF, ya que se ha reportado que su activación ocurre con la fosforilación de la cinasa ligada a integrinas (ILK) que a su vez activa a la vía Akt, que finalizan con la fosforilación de IGFBP5 intracelular, la cual activa diversas vías de señalización involucradas en la proliferación y supervivencia tumoral (Sureshbabu y col., 2011; Akkiprik y col., 2008).

De igual forma encontramos un incremento en la expresión de diversas moléculas no codificantes, principalmente de lncRNAs, encargados de la regulación de la expresión genética. Nuestro análisis destacó un incremento en la expresión del lncRNA LIN01061, el cual es un inductor y regulador de la supervivencia, proliferación y metástasis, en tumores de tiroides papilar y colangiocarcinomas (Yu, col., 2019; Wu, y col., 2018). Su mecanismo de acción ha sido denominado como competencia por RNA's endógenos (ceRNAs) debido a que interacciona con múltiples miRNA's, para la regulación de la expresión de cada uno de sus genes blancos, se estima que pueden ser 2,572 genes, esto de acuerdo a la base de datos lncRNA2Target v2.0 (123.59.132.21/lncrn-a2target/search.jsp) desarrollada por Liang y col. en 2018. Entre los genes regulados se encuentran los de IGFBP5, PNN, TANC2,

DHX9, RPPH1 y MTHFD1, los cuales se encontraron modificados en nuestro estudio y presentan una función en el desarrollo y progresión de diversos tipos de cáncer.

La insulina e IGF confieren una resistencia a los efectos de los tratamientos contra el cáncer, mediante la activación de diversas vías de señalización (Fox y col., 2013; Denduluri y col., 2015; Wairagu y col., 2015; Hamilton y col., 2017). En nuestro análisis se encontró un incremento en la expresión de las moléculas IGFPB5, LINC01061, PNN, NEAT1, KNPA4, LINC00641, SDH, que inhiben la activación de los procesos apoptóticos inducidos por diversos fármacos (Li, y col., 2019; Mini y col., 2019). Sin embargo no se conocen las vías en las que se encuentran involucradas así como de las interacciones entre sí, por lo que estudios posteriores se enfocarán en la determinación de su función en el desarrollo del cáncer de mama.

La determinación del efecto de la insulina en la adquisición de un fenotipo más agresivo junto con un estado de resistencia a los efectos del tamoxifeno en las células MCF-7 se realizó a través de los ensayos de citotoxicidad por cristal violeta al 0.5% y de viabilidad celular por azul tripano al 0.4%. Ambos ensayos demostraron que la incorporación de la insulina, tanto al medio hiperglucémico como en el medio de glucosa normal, incrementan la proliferación y supervivencia de las células tumorales, además de disminuir los efectos del tamoxifeno sobre las células MCF-7, conforme a lo expuesto en la figura 13. Estos efectos se pueden atribuir a los cambios en el transcriptoma inducidos por insulina, los cuales están asociados a la activación de los procesos de proliferación, antiapoptosis, migración, invasividad y metástasis, en células MCF-7 en un medio hiperglucémico. No obstante no se conocen las interacciones o mecanismos moleculares en los que se encuentran involucrados cada una de las moléculas sobre expresadas, por lo que las siguientes investigaciones se centrarán en el estudio de estos procesos.

Conclusiones.

- La insulina promueve cambios en el transcriptoma en las células MCF-7 en un ambiente hiperglucémico, en donde se encuentran modificados la expresión de 1,942 genes, de los cuales 930 están regulados a la baja y 1,012 regulados a la alta,
- De los 1,012 genes sobre-expresados el 16%, de estos genes son no codificantes y 84% son codificantes.
- Los principales transcritos sobre expresados son los de IGFBP5 y el gen largo no codificante LINC01061.
- Un microambiente de alta glucosa y alta insulina confiere un mayor porcentaje de supervivencia, favoreciendo una resistencia al tamoxifeno en la línea celular MCF-7.

Perspectivas del proyecto

En este proyecto de tesis evaluamos los cambios transcripcionales inducidos por acción de la insulina en las células MCF-7, en donde las moléculas con mayor tasa de cambio fueron la IGFBP 5 y LINC RNA01061, las cuales han sido reportadas como moléculas inductoras y reguladoras de las vías de señalización involucradas en la proliferación, crecimiento, migración y metástasis en distintos tipos de cáncer. Sin embargo no se conoce el papel que puedan tener en la inducción, desarrollo y progresión del cáncer de mama positivo a receptores de estrógenos.

Por lo que es necesario determinar la función y los procesos en los que se encuentran involucradas, ambas moléculas, esto con el fin de determinar si pueden ser utilizadas como agentes terapéuticos, para el control y/o eliminación del tumor, debido a que estas moléculas pudieran estar asociadas con la adquisición de un estado de resistencia a los tratamientos contra el cáncer de mama. Aunado a esto estas dos moléculas podrían ser utilizados como marcadores moleculares para el pronóstico de la evolución del cáncer de mamá en pacientes diabéticos

Por lo que nosotros planteamos que la continuación de este proyecto sea la identificación del papel del lncRNA LINC01061 en las vías de señalización para el desarrollo y progresión de las células MCF-7, así como de la determinación de su papel en la adquisición de un estado de resistencia a los efectos del tamoxifeno bajo un estado de hiperglucemia e insulina,

Bibliografía.

- Abbas, Z., Rehman, S. 2018. An overview of cancer treatment modalities. Neoplasm. doi:10.5772/intechopen.76558
- Abraham, J., Staffurth, J. 2011. Hormonal therapy for cancer. *Medicine*, 39(12), 723–727., doi:10.1016/j.mpmed.2011.09.006
- Aiello A., et al. 2010. HMGA1 protein is a positive regulator of the insulin-like growth factor-I receptor gene. *Eur J Cancer* 46(10):1919–1926. doi: 10.1016 / j.ejca.2010.02.050
- Akkiprik, M., Feng, Y., Wang, H., Chen, K., Hu, L., Sahin, A., ... Zhang, W. 2008. Multifunctional roles of insulin-like growth factor binding protein 5 in breast cancer. *BCR* 10(212).doi:10.1186/bcr2116
- Ali, S., Rasool, M., Chaoudhry, H., Pushparaj, N., Jha, P., Hafiz, P., Sarwar A., Jamal, M. 2016. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation*: 12(3): 135–139. doi :10.6026/97320630012135
- Alegria-Loyola, M. A., Galnares-Olalde, J. A., Mercado, M. 2017. Artículo de revisión: Tumores del sistema nervioso central. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 55(3): 330-340
- American Diabetes Association of Description, and Diabetes Mellitus. 2014. “diagnosis and classification of diabetes mellitus.” *Diabetes Care* 37(SUPPL.1): 81–90.
- Anjum, F., Razvi, N., Masood, M.A. 2017. Breast cancer therapy: a mini review. *MOJ Drug Des. Develop. Ther.*, 1(2):35-38. doi: [10.15406/mojddt.2017.01.00006](https://doi.org/10.15406/mojddt.2017.01.00006)
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. 2014. Type 1 diabetes. *Lancet*, 383(9911): 69–82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7
- Bartucci M., Morelli C., Mauro L., Andò S., Surmacz E. 2001. Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res.* 61(18): 6747-54.
- Bastarrachera, R., Fuenmayor R., Brajkovick I., Comuzzie, A., 2005. Entendiendo las causas de la obesidad a traves de la biología celular del adiposito. *Rev. Ven. Endo. & Met.* 3: 20-29
- Biplob, D., Arun, K., 2018. A review article on breast cancer. *Human Journal.* 11 (2): 284-298.
- Brownlee, M. 2001. Bioquímica y biología celular molecular de las complicaciones diabéticas. *Rev. Nature.* 414: 813–820. doi: 10.1038 / 414813a

- Brinton, L. A., Devesa, S. S. 1996. Chapter etiology and pathogenesis of breast cancer: incidence, demographics and environmental factors. In Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, Eds. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp159-68.
- Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C. R. 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(1). doi:10.1101/cshperspect.a009191
- Caicedo M., Quintero, E., Robledo, J. F., Perry, F., Ramírez, C., Duarte, C., Ángel, J., Díaz, S., Orozco, A., Viaña, L., Torregrosa, E., Torres, F., Sánchez, R., 2007. Cáncer de seno y hormonoterapia Estado actual. *Rev. Colomb. Cirugía*, 22(1): 47-71
- Cancer Genome Atlas Network. 2012. Retratos moleculares completos de tumores de mama humanos. *Rev. Nature*, 490 (7,418): 61–70. doi: 10.1038 / nature11412
- Casariago Z. J., Baudo J. E. 2004. Trabajo de revisión: melanoma. *Rev. Av. Periodon Implantol.* 16(3): 157-177
- Cervantes-Villagrana R, Presno-Bernal J. M. 2013. Fisiopatología de La Diabetes y Los Mecanismos de Muerte de Las Células β Pancreáticas. *Rev. Endo. Nut.* 21(3): 98–106.
- Chia, Y. H., Ellis, M. J., & Ma, C. X. 2010. Neoadjuvant endocrine therapy in primary breast cancer: indications and use as a research tool. *British journal of cancer.* 103(6): 759–764. doi:10.1038/sj.bjc.6605845
- Chiefari E., *et al.* 2013. A polymorphism of HMGA1 is associated with increased risk of metabolic syndrome and related components. *Sci Rep.* 3:1491 doi: 10.1038/srep01491
- Clemmons, D.R., Cammacho-Hubner, C., Coronado, E., Osborne, C.K. 1990. Insulin-like growth factor binding protein secretion by breast carcinoma cell lines: Correlation with estrogen receptor status. *Endo.*127:2679-2686
- Conget, Ignacio. 2002. Diagnóstico, Clasificación y Patogenia de La Diabetes Mellitus. *Rev. Esp. Cardiol.* 55(5):528–535.
- Connolly J, Kempson R, LiVolsi V, Page D, Patchefsky A, Silverberg S. 2004. Recommendations for the reporting of breast carcinoma. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology.
- Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuwanshi, S., Palapati, A., Gutti, R. K. 2019. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Mol. Inmu.* 112(82–92). doi: 10.1016/j.molimm.2019.04.011

- Denduluri, S. K., Idowu, O., Wang, Z., Liao, Z., Yan, Z., Mohammed, M. K., ... Luu, H. H. (2015). Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. *Genes & Diseases*. 2(1):13–25. doi:10.1016/j.gendis.2014.10.004
- Duan, W., Shen, X., Lei, J., Xu Q., Yu Y., Li, R., Wu E., Ma Q. 2014. Hyperglycemia, a Neglected Factor during Cancer Progression. *BioMed. Research Int*. 2014:1-10. doi: 10.1155/2014/461917
- Duarte M. J., Romero F. S., Espinosa L. R. F., Sánchez R. G. 2016 Diabetes y cáncer ¿es real la asociación? *Med Int Méx*. 32(3):318-329.
- Escobedo de la Peña J., Buitrón-Granados L., Ramírez-Martínez J., Chavira-Mejía R., Schargrotsky H., Champagne B. 2011. Diabetes en México, Estudio CARMELA. *Rev. Cir Cir*. 79(5):424-431
- Farooq, A. 2015. Structural and functional diversity of estrogen receptor-ligands. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(14):1372–1384. doi: 10.2174/1568026615666150413154841
- Fernández, Ma., De Santiago, A., Moreno, A., Carramiñana, F., López, F., Miravet, S., Segui, M., Soriana, T., ..., Huidrobo, Ca., 2015. Diabetes: clasificación, detección precoz y diagnóstico, Guías Clínicas: Diabetes Mellitus, American Diabetes Association, Standars of Medical Care in Diabetes 2015, 38(Suppl. 1;s1-s2):2-4.
- Flores-López, L.A., Martínez-Hernández, M.G., Viedma-Rodríguez, R., Díaz-Flores M., Baiza-Gutman, L. A. 2016. High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells. *Cell Oncol*. 39:365–378. doi: 10.1007/s13402-016-0282-8.
- Fox, E. M., Kuba, M. G., Miller, T. W., Davies, B. R., & Arteaga, C. L. 2013. Autocrine IGF-I/insulin receptor axis compensates for inhibition of AKT in ER-positive breast cancer cells with resistance to estrogen deprivation. *BCR*. 15(4) doi:10.1186/bcr3449
- Frystyk, J., Skjærbæk, C., Vestbo, E., Fisker, S., & Ørskov, H. 1999. Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of Type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 15(5):314–322. doi:10.1002/(sici)1520-7560(199909/10)15:5<314::aid-dmrr56>3.0.co;2-e
- Fuentes, N., & Silveyra, P. 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 116:135–170. doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001

- Fusco A., Fedele M. 2007. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7(12):899–910
- Gallagher E., LeRoith D. 2013. Epidemiology and molecular mechanisms tying obesity, diabetes, and the metabolic syndrome with cancer. *Rev. Diabetes and Cancer*. 36(2): S223-S237. doi10.2333/dsS13-2001.
- García-Becerra, R., Santos, N., Díaz, L., Camacho, J. 2012. Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: focus on signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance. *International journal of molecular sciences*. 14(1):108–145. doi:10.3390/ijms14010108
- Gil-Velázquez L., Sil-Acosta Ma., Domínguez-Sánchez E., Torres-Arreola L., Medina-Chávez J. 2013. Guía de práctica clínica Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc*. 51(1): 104-119
- Giuliano M, Trivedi MV, Schiff R. 2013. Bidirectional crosstalk between the estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor 2 signaling pathways in breast cancer: basis and clinical implications. *Breast Care*. 8(4):256-62.
- Giovannucci, E., Harlan D., Archer, M., Bergenstal R., Gapstur, S., Habel, L., Pollak M., Regensteiner J., Yee D., 2010. Diabetes and cancer. *Diabetes Care*, 33(7):1674-1682, doi. 10.2337/dc10-0666.
- Guillén, M.A. 2002. “Diabetes mellitus : cómo se manifiesta, con qué frecuencia y los síntomas de la diabetes: 54–62.
- Gregory, Justin M., Daniel J. Moore, Jill H. Simmons. 2013. Type 1 diabetes mellitus. *Pediatrics in Review*. 34(5): 203–15. doi: 10.1542/pir.34-5-203
- Gristina, V., Cupri, M. G., Torchio, M., Mezzogori, C., Cacciabue, L., Danova, M. 2015. Diabetes and cancer: A critical appraisal of the pathogenetic and therapeutic links. *Biomedical reports*. 3(2): 131–136. doi: 10.3892/br.2014.399
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., Olivares-Reyes, J. A. 2017. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: Una actualización. *Gaceta Medica de Mexico*, 153(2,): 214-228.
- Hamilton, N., Marquez-Garban, D., Mah, V. H., Elshimali, Y., Elashoff, D., Garon, E. B., ...Pietras, R. 2015. Estrogen receptor- β and the insulin-like growth factor axis as potential therapeutic targets for triple-negative breast cancer. *Critical reviews in oncogenesis*, 20(56): 373–390. doi: 10.1615/CritRevOncog.v20.i5-6.100
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

- Hanahan D., Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Rev. Cell.* 100: 57-70.
- Hecker E. 1976. Definitions and terminology in cancer (tumour) etiology. *Rev. Bull. World Health Organ.* 54:1-10
- Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. 2013. Diabetes En Mexico: el estado de la epidemia. 55(1): 129–36.
- Hemkens L.G., Grouven U., Bender R., Günster C., Gutschmidt S., Selke G. W., Sawicki P.T. 2009. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: a cohort study. *Diabetologia*, 52:1732-1744. doi:10.1007/s00125-009-1418-4
- Hewitt, S.C., Korach, K.S. 2002. Estrogen Receptors: Structure, Mechanisms and Function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 3: 193–200. doi: 10.1023/A:1020068224909
- Hinojosa J. C., Ramos R., Vital, V., 2010. Inhibidores de la aromatasa. Aplicaciones potenciales en medicina de la reproducción. *Rev. Mex. de Med. Reprod.* 3(2): 63-68
- Hitchler, M. J., Domann, F. E. 2009. Los defectos metabólicos proporcionan una chispa para el cambio epigenético en el cáncer. *Radiología libre y medica*, 47(2):115–127. doi: 10.1016 / j.freeradbiomed.2009.04.010
- Higgins, M. J., Rae, J. M., Flockhart, D. A., Hayes, D. F., Stearns, V. 2009. Pharmacogenetics of tamoxifen: who should undergo CYP2D6 genetic testing? *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 7(2): 203–213. doi:10.6004/jnccn.2009.0014
- Hosford, S. R., & Miller, T. W. 2014. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Pharmacogenomics and personalized medicine.* 7:203–215. doi: 10.2147/PGPM.S52762
- Hulka, B. S., Moorman, P. G. 2001. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Rev. Maturitas*, 38(1): 103–113. doi: 10.1016/s0378-5122(00)00196-1
- Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A., Korach, K. S. 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factorraction involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 658 – 4662. doi:10.1073/pnas.89.10.4658
- Idikio H. 2011. Review human cancer classification: a systems biology-based model integrating morphology, cancer stem, cell, proteomics, and genomics. *J. Cancer.* 2:107-115 doi: 10.7150 / jca.2.107

- Ito, Y. 2002. Chemotherapy and hormone therapy for breast cancer: current status and perspective. *JMAJ*. 45(10): 424–433,
- King R., Robins M. 2006. What is cancer? cancer biology. Third Edition. *Pearson Education Limited*. pp. 1-8
- Lakhotia, S., Mallick, B., Roy, J., 2019. Non-coding RNAs: ever-expanding diversity of types and functions.
- Larsson, S. C., Mantzoros, C. S., & Wolk, A. 2007. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 121(4), 856–862. doi:10.1002/ijc.22717
- Lee, C., An, D., & Park, J. 2016. Hyperglycemic memory in metabolism and cancer. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 26(2). doi:10.1515/hmbci-2016-0022
- Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. 2009. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med*; 133:1515-38.
- Liang Cheng, Pingping Wang, Rui Tian, Song Wang, Qinghua Guo, Meng Luo, Wenyang Zhou, Guiyou Liu, Huijie Jiang y Qinghua Jiang,2018, 'Lncrna2target V2.0: una base de datos completa para los genes objetivo de Lncrnas en Human and Mouse ', *Nucleic Acids Research*, gky1051-gky51
- Li, X., Li, J., Cai, Y., Peng, S., Wang, J., Xiao, Z. ... Wen, X. 2018. Hyperglycaemia-induced miR-301a promotes cell proliferation by repressing p21 and Smad4 in prostate cancer. *Cancer Letters*. 418: 211–220. doi :10.1016/j.canlet.2018.01.
- Li, W., Zhang, X., Sang, H. Zhou, Y., Shang, Ch., Wang, Y., Zhu H.. 2019 Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. *J. Exp. Clin. Cancer Res*.38 (327). doi: <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1309-6>
- Li, J., Liang, N., Long, X., Zhao, J., Yang, J., Du, X., ... Xing, J. (2019). SDHC-related deficiency of SDH complex activity promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via ROS/NFκB signaling. *Cancer Letters*. 461: 44-55 doi: 10.1016/j.canlet.2019.07.001
- Li, X., Yu, M., & Yang, C. (2019). YY1-mediated overexpression of long noncoding RNA MCM3AP-AS1 accelerates angiogenesis and progression in lung cancer by targeting miR-340-5p/KPNA4 axis. *J Cell Biochem*: 1-10 doi:10.1002/jcb.29448

- Macfarlane, L. A., Murphy, P. R. 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current genomics*, 11(7):537–561. doi: 10.2174-/138920210793175895
- Maffuz-Aziz A., Labastida-Almendaro S., Espejo-Fonseca A., Rodriguez-Cuevas S. 2017. Clinical and pathological features of breast cancer in a population of Mexico. *Cirugía y Cirujanos*. 85(3): 201-207 doi: <https://doi.org/10.1016/j.circir.2016.08.004>
- Malaguarnera, R. Belfiore, A. 2011. The insulin receptor: a new target for cancer therapy. *Frontiers in endocrinology*, 2(93). doi: 10.3389/fendo.2011.00093
- Malhotra, G., Zhao, X., Band, H., Band, V. 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. & Ther.* 10(10): 955-960. doi: 10.4161/cbt.10.10.13879
- Masur, K., Vetter, C., Hinz, A., Tomas, N., Henrich, H., Niggemann, B., & Zänker, K. S. 2011. Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *British j. cancer*, 104(2): 345–352. doi:10.1038/sj.bjc.6606050
- Maughan, K., Lutterbie M., Ham P., 2010. Treatment of Breast Cancer. *Am. Fam. Physician*. 81(11) 1339-1346.
- McPherson M., Steel C. M., Dixon J. M. 2000. Clinical Review ABC of Breast Diseases; Breast cancer-epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ*. 321: 624-628.
- Mediavilla, J.J., 2002, La diabetes Mellitus tipo 2, Rev. Med. Integral, No. 39 Vol. 1, pp. 25-35. *Rev. Fac. Med. UNAM*. 50(3): 121-124.
- Meléndez E., Sánchez G., Ramírez M., Cavrioto A., Cervantes E.2007. Diabetes mellitus: aspectos modernos de la problemática.
- Mendivil, C. O., Sierra, I. D. 2005. Acción insulínica y resistencia a la insulina: Aspectos moleculares. *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Col.* 53: 235-243.
- Mercadillo P., Moreno L. M. 2013. Fisiopatología del carcinoma epidermoide. *Rev. Mex. Dermatol.* 57(2): 118-127.
- Mini, E., Lapucci, A., Perrone, G., D'Aurizio, R., Napoli, C., Bruglia, M., ...Nobili, S. 2019. RNA sequencing reveals PNN and KCNQ1OT1 as predictive biomarkers of clinical outcome in stage III colorectal cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *Int J. Cancer*. 145: 2580-2593. doi:10.1002/ijc.32326
- Miranda-Garduño L., Reza-Albarrán A., 2008. Obesidad, inflamación y diabetes, *Gac. Med. Méx.* 144(1):39-46.

- Ochoa, A., González, B.P., González, L., González, C., Fuentes C., Barragán P., 2014. El papel de los microRNAs (miRNAs) en el cáncer de mama. *An. Med. Asoc. Med. Hosp. ABC.* 59(4) 267-270
- Olivares, J. A., Arellano A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev. Edu. Bioq.* 27(1): 9-18
- Organización Mundial de la Salud. 2016. WHO/NMH/NVI/16.3, Rescatado de: <https://www.who.int/diabetes/global-report/en/>, el 26/06/2019 a las 10:20 p.m.
- Osborne C.K., Shou J, Massarweh S, Schiff R. 2001. Estrogen Receptor: Current Understanding of Its Activation and Modulation. *Rev. Clinical Cancer Research.* 7: 4338s-4342s.
- Osborne C.K., Shou J, Massarweh S, Schiff R. 2005. Crosstalk between Estrogen Receptor and Growth Factor Receptor Pathways as a Cause for Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research.* 11(2): 865s.
- Osborne CK, Schiff R. 2011. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med.* 62: 233-47.
- Páez JA, Triana JD, Ruiz MA, Masmela KM, Parada YA, CA Peña, et al. 2013. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Cuarzo*, 22(1): 13-38 doi: [10.26752/cuarzo.v22.n1.144](https://doi.org/10.26752/cuarzo.v22.n1.144)
- Parhak, R., Jha, A., Neupane, P.R., Chalise S., Basnyat, A.S. 2016. Histopathological evaluation of carcinoma of breast. *Journal of Pathology of Nepal.* 16: 922-927. doi: <https://doi.org/10.3126/jpn.v6i11.15674>
- Perou, C., Sørlie, T., Eisen, M. y col. 2000. Retratos moleculares de tumores de mama humanos. *Nature.* 406: 747–752 doi: 10.1038 / 35021093
- Pogribny IP, vicepresidente de Tryndyak, Muskhelishvili L, Rusyn I, Ross SA. 2007. Deficiencia de metilo, alteraciones en las modificaciones globales de histonas y carcinogénesis. *J Nutr.* 137: 216S – 222S
- Pollak, M. N., Schernhammer, E. S., & Hankinson, S. E. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature Reviews Cancer*, 4(7): 505–518. doi: 10.1038/nrc1387
- Pothiwala P, Jain SK, Yaturu S. 2009. Síndrome metabólico y cáncer. *Metab Syndr Relat Disord.* 7: 279–88.
- Reyes, F., Pérez, Ma. L., Figueredo, E.A., Ramírez M., Jiménez, Y., 2016, Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2, *Rev. Correo Científico Médico de Holguín*, 20(1): 98-121.

- Rodríguez Y., Dodoy J. I. 2008. Tumor de células germinales. *Rev. Fac. Med.* 16(2): 200-214
- Rojas-Martínez, R., Basto-Abreu, A., Aguilar-Salinas, C. A., Zárate-Rojas, E., Villalpando, S., Barrientos-Gutiérrez, T. 2018. "Prevalencia de Diabetes Por Diagnóstico Médico Previo En México." *Salud Pública de México* 60(3, may-jun): 224. doi: <https://doi.org/10.21149/8566>
- Rozenbaum, H. 2008. Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM). *EMC-Ginecología-Obstetricia*, 44(2):1–8. doi: 10.1016/s1283-081x(08)70811-7
- Ryu, T. Y., Park, J., Scherer, P. E. 2014. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes metab j*, 38(5): 330–336. doi :10.4093/dmj.2014.38.5.330
- Sachdev D, Yee D. 2001. The IGF system and breast cancer. *Endocr Related Cancer*, 8:197–209
- Salas P, Santos, J.L, Pérez F. 2013. Genética de La Diabetes Mellitus Tipo 2. *Chil. Endo. Diabetes* 6 (1): 15-22.
- Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Büsselberg, D. 2018. Challenges and perspectives in the treatment of diabetes associated breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*,70: 98–111. doi:10.1016/j.ctrv.2018.08.004
- Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK. 2005. Los patrones globales de modificación de histonas predicen el riesgo de recurrencia del cáncer de próstata. *Naturaleza*. 435 : 1262-1266
- Sheikh, M.S., Shao, Z.M., Clemmons, D.R., LeRoith, D., Roberts, Jr., C.T., Fontana, J.A. 1992. Identification of the insulin-like growth factor binding proteins 5 and 6 (IGFBP-5 and 6) in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183: 1003- 1010
- Sheikh, M. S., Shao, Z.-M., Hussain, A., Clemmons, D. R., Chen, J.-C., Roberts, C. T., ... Fontana, J. A. 1993. Regulation of insulin-like growth factor-binding-protein-1, 2, 3, 4, 5, and 6: Synthesis, secretion, and gene expression in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells. *J Cell Physiology*, 155(3): 556–567. doi:10.1002/jcp.1041550314
- Siddle K, Urso B, Niesler CA, et al. Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:513–25

Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, *et al.* 2005. American Diabetes Association. Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*; 28(1):186–212.

74. Stingl, J., Caldas, C. 2007. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat. Rev. Cancer*. Vol. 7. pp. 791–799. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc2212>

Stoica, A., Katzenellenbogen, B. S., & Martin, M. B. 2000. Activation of Estrogen Receptor- α by the Heavy Metal Cadmium. *Molecular Endocrinology*,14(4): 545–553. doi:10.1210/mend.14.4.0441

SS/INSP. 2012. “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2012. (ENSANUT MC 2012).” Instituto Nacional de Salud Pública 2012 (Ensanut): 151.

SS/INSP. 2016. “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. (ENSANUT MC 2016).” Instituto Nacional de Salud Pública 2016(Ensanut): 151.

<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf%0Ahttps://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT>.

Sonsoles, M., Rodríguez, J. J., Maslyk, M., de Pascual, B., Ramos, A., 2010. SERMs: un largo camino desde el tamoxifeno hasta las nuevas estrategias para el diseño de fármacos más selectivos. *Inv. Quim.*106(3): 199-206

Stingl J, Caldas C. 2007. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*, 7:791-9.

Suh, S., & Kim, K.-W. 2011. Diabetes and Cancer: Is Diabetes Causally Related to Cancer? *Diabetes & Metabolism Journal*, 35(3): 193. doi :10.4093/dmj.2011.35.3.193

Sun, G. y Kashyap, SR. 2011. Riesgo de cáncer en la diabetes mellitus tipo 2: vínculos metabólicos y consideraciones terapéuticas. *Revista de nutrición y metabolism.* 70(8):183. doi: 10.1155 / 2011/708183

Suissa S., Azoulay L., Dell’Aniello S., Evans M., Vora J., Pollak M. 2011. Long-term effects of insulinw glargine on the risk of breast cáncer. *Rev. Diabetologia*, 54: 2254-2265. doi: 10.1007/s00125-011-2190-9.

Sureshbabu, A., Okajima, H., Yamanaka, D., Tonner, E., Shastri, S., Maycock, J., ... Flint, D. 2012. IGFBP5 induces cell adhesion, increases cell survival and inhibits cell migration in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Cell Science*, 125(7): 1693–1705. doi:10.1242/jcs.092882

- Tang, Z., Zhang, R., Lian, Z. X., Deng, Sh. L., Yu K., 2019. Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Rev. Cells.* 8: 11-23. doi: 10.3390/cells8101123
- Tang X., Yang L., He Z., Liu J. 2012. Insuline Glargine and Cancer Risk in Patients with Diabetes: A Meta-Analysis. *Plos one.* 7(12) doi: 10.1371/journal.pone.0051814.
- Terán J., Teppa A., 2005. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SEMRs): bioquímica, farmacología y aplicación clínica en ginecología. *Gine. Obstet Mex.* No. 73, pp. 424-435
- Tornaletti S, Pfeifer GP. Metilación completa e independiente del tejido de los sitios CpG en el gen p53: implicaciones para las mutaciones en los cánceres humanos. *Oncogen* 1995; 10 : 1493–1499
- Vella, V., Milluzzo, A., Scalisi, N. M., Vigneri, P., & Sciacca, L. 2018. Insulin Receptor Isoforms in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(11): 3615. doi:10.3390/ijms19113615
- Viedma-Rodríguez, R., Martínez-Hernández, M.G., Flores-López, L.A. Baiza-Gutman, L.A. 2018. Epsilon-aminocaproic acid prevents high glucose and insulin induced-invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells, modulating the plasminogen activator system. *Mol. Cell. Biochem.* 437: 65–80. doi: <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3096-8>
- Vigneri P., Frasca F., Sciacca L., Pandini G., Vigneri R., 2009, Diabetes and Cancer, *Rev. Endocrine-Related Cancer*, 16: 1103-1123. DOI. 10.1677/ERC-09-0087.
- Warbug O. 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science.* 123: 309–314.
- Wairagu, P. M., Phan, A. N., Kim, M. K., Han, J., Kim, H. W., Choi, J. W., ... Jeong, Y. 2015. Insulin priming effect on estradiol-induced breast cancer metabolism and growth. *Cancer biology & therapy*, 16(3): 484–492. doi:10.1080/15384047.2015.1016660
- Wellen, K. E., Thompson, C. B. 2012. A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4): 270–276. doi:10.1038/nrm3305
- Wolf, I., Sadetzki, S., Catane, R., Karasik, A., Kaufman, B. 2005. Diabetes mellitus and breast cancer. *The Lancet Oncology*, 6(2), 103–111. doi:10.1016/s1470-2045(05)01736-5
- Wu, X., Yan, Y., Li, H., Yu, T., Huang, Y., Shi, W., Gao, L., Ma, L., Hu, Y., 2018. DNA copy number gain-mediated lncRNA LINC01061 upregulation predicts por

prognosis and promotes papillary thyroid cancer progression. *Bioch. & Bioph. Res. Comm.* doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.032>

Xu Chun-Xia, Zhu Hong-Hong, Zhu Yi-Min, 2014, Diabetes and Cancer; Associations, mechanisms, and implications for medical practice, *World Journal of Diabetes*, 5(3): 372-380, doi: 10.4239/wjd.v5.i3.372